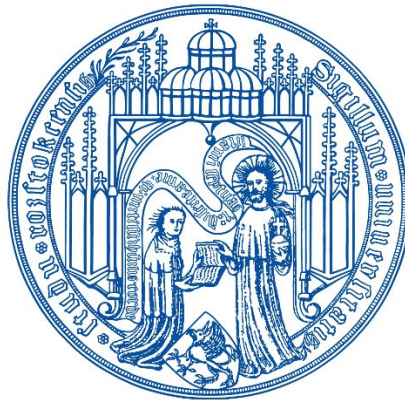


Aus dem
Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie
der Universität Rostock
Direktor: Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar

**Untersuchung des antifibrotischen Potenzials von Foxf1-siRNA
im Modell der akuten und chronischen CCl₄-Leberschädigung**



Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von
Tobias Rotberg, geb. 08.04.1988 in Speyer
Rostock 2016
Dekan: Prof. Dr. Emil Reisinger

Dekan: Prof. Dr. med. Emil Reisinger

1. Gutachter:

Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar
Institut für Experimentelle Chirurgie Universitätsmedizin Rostock
Schillingallee 69a, 18057 Rostock

2. Gutachter:

Prof. Dr. med. Andreas Geier
Medizinische Klinik und Poliklinik II, ZIM
Oberdürrbacher Str. 6, 97080 Würzburg

3. Gutachter:

Prof. Dr. med. Georg Lamprecht
Zentrum für Innere Medizin Klinik II, Abt. Gastro und Endokrinologie
Ernst-Heydemann-Str. 6, 18057 Rostock

Datum der Einreichung: 03.10.2016

Datum der Verteidigung: 21.06.2017

In großer Dankbarkeit

meinen Eltern

1	Abkürzungsverzeichnis	6
2	Zusammenfassung	8
3	Einleitung	10
3.1	Leberfibrose	10
3.1.1	Definition	10
3.1.2	Ätiologie	11
3.1.3	Hepatische Sternzelle	12
3.1.4	Foxf1	14
3.1.5	Klinik	15
3.1.6	Therapie	19
3.2	siRNA	20
3.3	DBTC-Formulierungen	22
3.4	Zielsetzung	25
4	Material und Methoden	26
4.1	Versuchstiere	26
4.2	Praktische Anwendung	26
4.2.1	CCl₄ Applikation	26
4.2.2	Anästhesie	27
4.2.3	Intravenöse Applikation der DBTC-Formulierungen	28
4.2.4	Blut- und Gewebeentnahme	28
4.3	Versuchsaufbau	29
4.3.1	Akutes CCl₄ Modell	29
4.3.2	Chronisches CCl₄ Modell	30
4.4	Untersuchungstechniken	31
4.4.1	Vollblutanalyse	31
4.4.2	Plasmaanalyse	31
4.4.3	Histologie	31

4.4.4	Molekularbiologie	34
4.4.5	Statistik.....	36
5	Ergebnisse	38
5.1	Akutes CCl ₄ Modell.....	38
5.1.1	Zustand der Tiere.....	38
5.1.2	Foxf1-Silencing	38
5.1.3	Vollblutanalyse	39
5.1.4	Leberschaden	40
5.1.5	Aktivierung hepatischer Sternzellen.....	42
5.2	Chronisches Modell	43
5.2.1	Zustand der Tiere.....	43
5.2.2	Foxf1-Silencing	44
5.2.3	Vollblutanalyse	45
5.2.4	Leberschaden	46
5.2.5	Leberfibrose	47
6	Diskussion.....	50
6.1	Material und Methoden	50
6.2	Ergebnisse	58
6.3	Zusammenfassung und Ausblick	63
7	Thesen zur Dissertation	66
8	Literaturverzeichnis.....	68
9	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	80
10	Selbstständigkeitserklärung.....	81

1 Abkürzungsverzeichnis

Ad	Adenovirus
ALT	Alanin-Aminotransferase
AP	Alkalische Phosphatase
AST	Aspartat-Aminotransferase
BDL	bile duct ligation
$\text{CCl}_3 \cdot$	Trichlormethyl-Radikal
CCl_4	Tetrachlorkohlenstoff
CYP2E1	Cytochrome P450 2E1
DEN	Diethylnitrosamin
DMN	Dimethylnitrosamin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EZM	Extrazelluläre Matrix
Fox	Forkhead-Box
GLDH	Glutamatdehydrogenase
H.E.	Hämatoxylin Eosin
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCT	Hämatokrit
HGB	Hämoglobinwert
HGF	Hepatocyte growth factor
HSC	Hepatische Sternzelle
i.p.	intraperitoneal
IFN- γ	Interferon- γ
IL-10	Interleukin-10
KG	Körpergewicht
Luci	Luciferase
MEOS	Mikrosomale Ethanol-Oxidierende System
miRNA	micro-RNA
MMP-9	Matrixmetalloproteinase-9

mRNA	messenger-RNA
N ₂ O	Stickstoffmonoxid
NAFLD	Nichtalkoholische Fettlebererkrankung
NASH	Nichtalkoholische Steatohepatitis
O ₂	Sauerstoff
ODN	Oligodesoxynukleotide
OLT	Orthotrope Lebertransplantation
PBC	Primär Biliäre Cirrhose
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PLT	Thrombozytenzahl
PPAR γ	Peroxisomen Proliferator-aktivierter Rezeptor- γ
PSC	Primär Sklerosierende Cholangitis
RBC	Erythrozytenzahl
RISC	RNA induced silencing complex
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RT	Reverse Transkription
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
shRNA	small hairpin-RNA
siRNA	small interfering-RNA
TAA	Thioacetamid
TGF- β 1	Transforming growth factor- β 1
WBC	Leukozytenzahl
WT	Wildtyp
α -SMA	α -smooth muscle actin

2 Zusammenfassung

Durch die weltweit wachsende Inzidenz und Mortalität stellt die Leberzirrhose ein Krankheitsbild mit hoher sozioökonomischer Problematik dar. Abgesehen von der Orthotropen Lebertransplantation (OLT) als *Ultima Ratio*, steht bislang kein kuratives Verfahren zur Behandlung der Leberzirrhose zur Verfügung. Die mangelnde Eignung einiger Patienten für die OLT sowie die darüber hinaus bestehende Organmangelsituation machen die Entwicklung neuer Therapiestrategien erforderlich. Die Differenzierung der ruhenden hepatischen Sternzelle (HSC) zu Kollagen-produzierenden Myofibroblasten beschreibt im Rahmen der Fibrosierung den wesentlichen pathogenetischen Schritt und führt durch die resultierende Kollagenablagerung im Leberparenchym zur Vernarbung des Organs. Aufgrund dieser Schlüsselfunktion stellen die HSC sowie deren Signalkaskaden vielversprechende Targets für eine antifibrotische Therapie dar. Die gentherapeutische Modulation der HSC-Aktivierung ist hierbei als relativ neuer Forschungsbereich besonders vielversprechend. Foxf1 gilt als bedeutender HSC-aktivierender Transkriptionsfaktor und ist daher als Ziel einer antifibrotischen Therapie besonders interessant. Unter Nutzung des Prinzips der RNA-Interferenz sollte somit durch gezieltes Foxf1-Gen-Silencing die HSC-Aktivierung unterbunden und somit ein hepatoprotektiver Effekt erzielt werden. Dies wurde durch die intravenöse Applikation von leberspezifischen DBTC-Foxf1-siRNA Lipoplexen im Modell der akuten sowie chronischen CCl₄-induzierten Leberschädigung untersucht. Im akuten Modell erhielten männliche BALB/c Mäuse eine prophylaktische DBTC-Foxf1-siRNA Applikation 48 h vor, sowie einmalig 24 h nach der intraperitonealen CCl₄-Injektion. Zum Untersuchungszeitpunkt 72 h nach CCl₄-Gabe konnte ein Foxf1-mRNA-Knockdown nachgewiesen werden, welcher sich allerdings nicht auf die histologisch, immunhistochemisch sowie laborchemisch verifizierte Leberschädigung auswirkte. Deshalb muss davon ausgegangen werden, dass ein Foxf1-Silencing keinen Einfluss auf die CCl₄-induzierte akute Leberschädigung ausübt. Die chronische Leberschädigung erfolgte durch zweimal wöchentliche CCl₄-Injektionen in männlichen BALB/c Mäusen über einen Zeitraum von 6 Wochen. Nach 4 Wochen kamen alle 72 h simultane therapeutische DBTC-Foxf1-siRNA Injektionen hinzu. 6 Wochen nach primärer CCl₄-Injektion konnte weder ein Foxf1-mRNA Knockdown noch ein hepatoprotektiver Effekt durch die Foxf1-

siRNA Behandlung beobachtet werden. Da in unserer Arbeitsgruppe in einer Studie zum cholestatischen Leberschaden jedoch beeindruckende hepatoprotektive Effekte von DBTC-Foxf1-siRNA nachgewiesen werden konnten, sind Modell-spezifische Unterschiede als Ursache für die unterschiedliche Wirkung wahrscheinlich und eine generelle Ineffektivität dieses therapeutischen Ansatzes auszuschließen. Die vorliegende Studie verdeutlicht, dass potenzielle Therapiegene bzw. die Wirksamkeit von Therapeutika in verschiedenen Modellen und Pathologien untersucht werden sollten.

3 Einleitung

3.1 Leberfibrose

3.1.1 Definition

Die Leber ist das zweitgrößte Organ unseres Körpers und macht mit 1,5 – 2 kg ca. 2-5 % des Körpergewichts aus (Silbernagl, 2010) (Abb. 1 A). Als zentrales Stoffwechselorgan nimmt sie neben ihrer vielfältigen Synthesefunktion die wesentliche Metabolisierungs- bzw. Entgiftungsfunktion in unserem Organismus wahr. Durch den Kontakt mit Giftstoffen jeglicher Art kann es abhängig von der Dosis akut und langfristig zur Schädigung des Lebergewebes kommen. Hierbei führt die chronische Leberschädigung in Verbindung mit der Ablagerung von extrazellulären Matrixproteinen zur Leberfibrose, welche charakteristisch für die meisten chronischen Lebererkrankungen ist (Friedman, 2003).

Die Leberzirrhose (Abb. 1 B) beschreibt das Folgestadium der Leberfibrose und geht mit hoher Morbidität und Letalität einher. Der histologische Nachweis von Regeneratknoten und fibrotischen Septen sichert dabei die Diagnose (Anthony *et al.*, 1977). Weltweit gehört die Leberzirrhose zu den 14 häufigsten Todesursachen mit einer Letalität von 1.03 Millionen/Jahr (Lozano *et al.*, 2012). Für Europa werden derzeit 170.000 Todesfälle pro Jahr beschrieben (Blachier *et al.*, 2013).

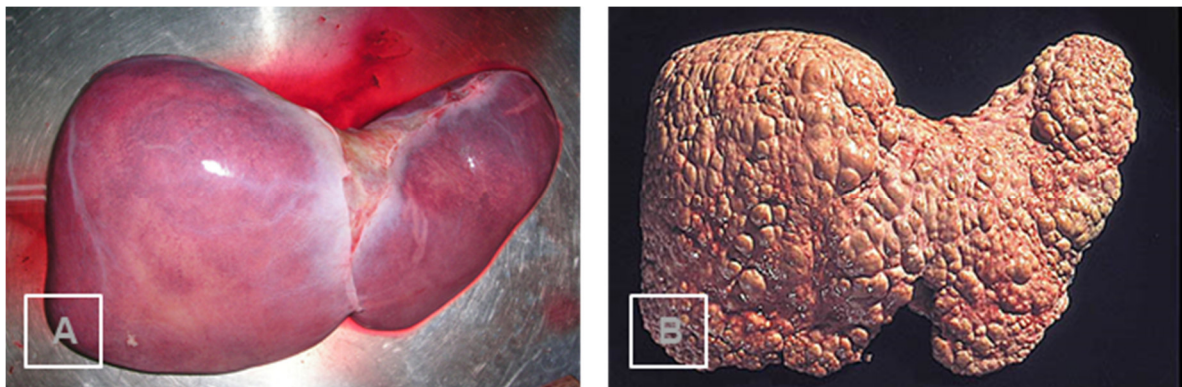


Abbildung 1: Makroskopisches Bild einer gesunden Leber (A) sowie einer Leber mit fortgeschrittener Leberzirrhose (B) (http://www.gesundheit.de/sites/default/files/images/roche/pics/a21866.000-1_big.jpg 16.09.2016, <https://de.wikipedia.org/wiki/Leber> 16.09.2016).

3.1.2 Ätiologie

Die Leberfibrose wird durch viele unterschiedliche Erkrankungen bedingt. Dabei machen Alkoholabusus und virale Hepatitiden den größten Anteil aus (Williams, 2006). 5% der deutschen Bevölkerung betreiben schädlichen Alkoholkonsum (Frauen > 20 g/d; Männer > 30 g/d), was zu einer Sterblichkeit von 30 Männern bzw. 10 Frauen pro 100.000 Einwohner/Jahr führt (Herold, 2011). Dabei werden 25% der Leberzirrhose- und HCC (Hepatozelluläres Karzinom)-bedingten Todesfälle exzessivem Alkoholkonsum zugeschrieben (Rehm *et al.*, 2003).

Unter den viralen Hepatitiden spielen für die Entwicklung der Leberzirrhose lediglich Hepatitis B und C eine Rolle, da sie als Einzige einen chronischen Verlauf aufweisen. Trotz bestehender Immunisierungsmöglichkeit sind ca. 1/3 der Weltbevölkerung mit Hepatitis B infiziert. Davon sind 240 Mio. Menschen chronische Virusträger und haben damit ein 25%iges Risiko an Leberzirrhose bzw. hepatozellulärem Karzinom zu erkranken (Margolis *et al.*, 1995).

Aufgrund fehlender Immunisierungsmöglichkeit ist Hepatitis C mit 130 Mio. erkrankten Menschen weltweit (Williams *et al.*, 2006) und dem Leberzirrhose-Risiko chronisch aktiver HCV-Träger von 20% (Herold, 2011) eine große medizinische Herausforderung. Weltweit sind die chronisch verlaufenden viralen Hepatitiden für >50% der Zirrhose- und HCC-Fälle verantwortlich (Perz *et al.*, 2006).

Aufgrund des immer weiter zunehmenden Bewegungsmangels und der Überernährung rückt in den letzten Jahren das Krankheitsbild der Nichtalkoholischen Fettlebererkrankung (NAFLD) mit den Stadien *Steatosis hepatis* und Nichtalkoholischer Steatohepatitis (NASH) immer mehr in den Fokus der Aufmerksamkeit. Abdominelle Fettleibigkeit, Bluthochdruck, Hypertriglyceridämie sowie periphere Insulinresistenz werden unter dem Begriff des metabolischen Syndroms zusammengefasst (Herrmann *et al.*, 2010) und sind Hauptursache der Erkrankung. Trotz günstiger Prognose der blanden Leberverfettung und der Entwicklung einer Leberzirrhose in lediglich 5% der Fälle, steigt die Bedeutung der NAFLD aufgrund wachsender Inzidenzen. Derzeit leiden ca. 20% der erwachsenen Bevölkerung in den Industrienationen am beschriebenen Krankheitsbild (Herold, 2011).

Cholestatische Lebererkrankungen führen durch Aufstau von Gallenflüssigkeit zur Schädigung der Hepatozyten, verursachen in 5-15% der Fälle chronische Leberer-

krankungen (Kuntz & Kuntz, 2008) und sind in 15% der Fälle für eine Lebertransplantation verantwortlich (O'Leary *et al.*, 2008). Neben Gallensteinen als häufigste Ursache der Cholestase können Autoimmunerkrankungen wie Autoimmunhepatitis, PSC (Primär Sklerosierende Cholangitis) und PBC (Primär Biliäre Cirrhose) zur Ausbildung einer Leberzirrhose führen. Die PBC ist damit für 1% der Zirrhose-bedingten Todesfälle weltweit verantwortlich (Kaplan & Gershwin, 2005).

Stoffwechselerkrankungen wie Hämochromatose, M. Wilson oder α 1-Antitrypsinmangel sind seltene Ursachen einer Leberzirrhose. Bei der autosomal rezessiv vererbten Hämochromatose kommt es durch die Mutation des HFE-Gens zur vermehrten Eisenresorption im Dünndarm und der Ablagerung im Gewebe. Die Ablagerung in der Leber führt in 75% zur Ausbildung einer Leberzirrhose. Die verminderte Kupferausscheidung und die dadurch bedingte Ablagerung im Gewebe wird durch das Krankheitsbild des M. Wilson beschrieben. Der autosomal rezessiv vererbte Gendefekt hat eine gute Prognose und führt nur unbehandelt zur Ausbildung einer Leberzirrhose. Weitere seltene Ursachen sind chemische Noxen wie Arsen oder Tetrachlorkohlenstoff. Im Rahmen einer chronischen Rechtsherzinsuffizienz kommt es durch den chronischen Blutrückstau in die Leber zur Schädigung der Hepatozyten und zur „Kardialen Zirrhose“. Der komplette Lebervenenverschluss, welcher durch das Budd-Chiari-Syndrom beschrieben wird, führt mit ähnlichem Pathomechanismus zu einer stauungsbedingten Schädigung der Leberzellen und zur Ausbildung einer Leberzirrhose (Herold, 2011)

Trotz stetiger Weiterentwicklung in der Medizin und damit verbundenen umfassenden diagnostischen Möglichkeiten gelingt es bislang nicht, in allen Fällen die Ätiologie der Leberzirrhose zu verifizieren, sodass ca. 5% der Ursachen ungeklärt bleiben (Kuntz *et al.*, 2008).

3.1.3 Hepatische Sternzelle

Bereits im 19. Jahrhundert wurde die hepatische Sternzelle (HSC) erstmals von Karl Wilhelm von Kupffer beschrieben. Fälschlicherweise machte er zum damaligen Zeitpunkt keinen Unterschied zwischen hepatischen Sternzellen und den Kupffer-Zellen, welche ortsansässige Makrophagen der Leber darstellen und 80% aller Körpermakrophagen ausmachen (Bouwens *et al.*, 1986). Diese Fehlannahme führte zum

Gebrauch des teilweise noch heute fälschlich genutzten Begriffs der Kupffer-Sternzelle.

Die Herkunft der HSC ist umstritten. Während einige Autoren behaupten, die Leberschädigung führe zu einer epithelial-mesenchymalen Umwandlung von Leberepithelzellen zu HSC (Sicklick *et al.*, 2006), gehen andere Studien von einer Abstammung aus Mesenchymalzellen des Knochenmarks aus (Baba *et al.*, 2004; Miyata *et al.*, 2008). Während die Herkunft der HSC weiterhin kontrovers diskutiert wird, ist deren anatomische Lokalisation in der Leber eindeutig geklärt.

Die HSC, welche die Hauptpopulation mesenchymaler Zellen in der Leber darstellen, sind zwischen sinusoidalen Endothelzellen und epithelialen Hepatozyten im Dissé-Raum lokalisiert (Abb. 2) (Wake, 1980; Friedman, 2008) und machen mit 5-8% aller Leberzellen ca. 1% des Gesamtlebergewichts aus (Geerts, 2001).

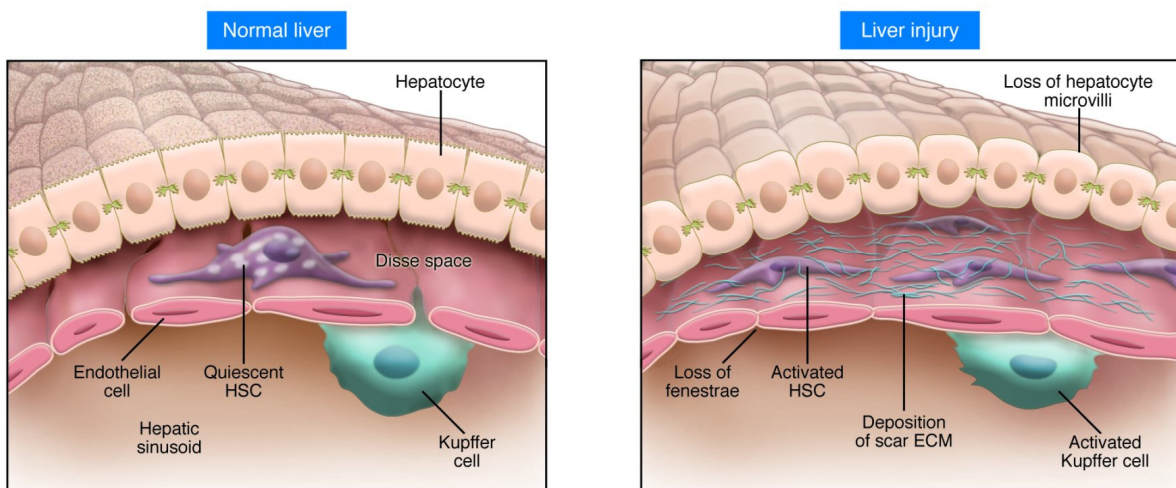


Abbildung 2: Anatomische Lokalisation der HSC in der gesunden Leber (links) sowie die sinusoidalen Ereignisse in der Entwicklung der Leberfibrose (rechts) (nach Iredale, 2007).

Der Prozess der Leberfibrosierung ist durch ein Zusammenspiel unterschiedlichster zellulärer Subpopulationen charakterisiert. Darin einbezogen werden Parenchymzellen, Nicht-Parenchymzellen sowie infiltrierende Immunzellen. Abhängig von der Art der Schädigung kommt es zu hepatozellulärer Nekrose bzw. Apoptose mit Freisetzung von Zytokinen und anderen Mediatoren. Bei diesen löslichen Mediatoren üben TGF- β 1, PDGF und TNF eine wesentliche aktivierende Funktion aus (Schon & Weiskirchen, 2014). Diese können jedoch auch durch andere Zelltypen wie Endothelzellen, Kupffer-Zellen und Lymphozyten freigesetzt werden und führen durch

Aktivierung der HSC zur Initiierung des Fibrosierungsprozesses (March *et al.*, 2009; Ramachandran *et al.*, 2012; Marra *et al.*, 2009; Elpek, 2014; Lee *et al.*, 2015b).

Damit stellt die HSC die Schlüsselzelle im Fibrosierungsprozess dar, wenngleich auch andere Zellen und Abläufe signifikante Beiträge zur Pathogenese leisten (Trautwein *et al.*, 2015). Während die Hauptfunktion der ruhenden/inaktiven HSC in der Speicherung von Vitamin A und dessen Metabolismus besteht (Blomhoff & Wake, 1991; Wake, 1971), führt der Aktivierungsprozess zu einer phänotypischen Transformation hin zu Fibroblasten-ähnlichen Zellen (Bataller & Brenner, 2005; Hernandez-Gea & Friedman, 2011; Friedman, 2008) mit resultierender erhöhter Zellkontraktilität und massiver Produktion von Kollagen1 und 3 (Abb. 2).

Obwohl mehrere hepatische Zelltypen die Fähigkeit besitzen EZM-Proteine zu synthetisieren, stellen HSC die Hauptquelle von EZM bei chronischen Lebererkrankungen dar (Eng & Friedman, 2000). Die Ablagerung von Glykoproteinen, Proteoglykanen und Kollagen als Bestandteile dieser EZM führt dabei zur Bindegewebsvermehrung im Leberparenchym und folglich zur Ausbildung einer Bindegewebsnarbe. Im fortgeschrittenen Stadium resultiert einerseits eine Verminderung der hepatozellulären Funktion und andererseits ein zunehmender intrahepatischer Widerstand, der durch den resultierenden Blutrückstau die portale Hypertension bedingt (Friedman, 2008; Bataller & Brenner, 2001).

3.1.4 Foxf1

Durch die gesicherte Schlüsselfunktion der HSC im Rahmen der Leberfibrosierung ist das Interesse an molekularen Regulationsmechanismen, welche zur Einleitung bzw. Aufrechterhaltung der HSC-Aktivierung führen, deutlich gestiegen (Mann & Smart, 2002). Die Modulation der Aktivierung könnte einerseits aus der Induktion von aktivierenden Transkriptionsfaktoren und andererseits aus dem Verlust von inhibierenden Signalen resultieren (Abshagen *et al.*, 2015a). Bislang wurden in Säugtieren einige Transkriptionsfaktoren identifiziert, die sowohl aktivierend als auch hemmend auf die HSC einwirken. Dabei stellen aktivierende Transkriptionsfaktoren den direktesten transkriptionalen Signalweg dar, um die HSC-Aktivierung zu initiieren (Friedman, 2008).

Einer dieser aktivierenden Transkriptionsfaktoren ist Foxf1 aus der Familie der Fork-head-Box (Fox)-Transkriptionsfaktoren. Seit der Identifizierung der ersten Fox-Gene hat sich deren Bedeutung durch die Entdeckung der unterschiedlichsten Entwicklungsprozesse in Eukaryonten stetig erhöht (Lehmann *et al.*, 2003). Im Rahmen der Entwicklung regulieren sie das Zellwachstum und deren Differenzierung, sind maßgeblich an der embryonalen Entwicklung beteiligt und haben durch Beeinflussung des Glukosestoffwechsels Anteil an metabolischen Funktionen (Duncan, 2000; Kaufmann & Knochel, 1996; Kaestner, 2000; Lin *et al.*, 1997).

Foxf1 spielt eine entscheidende Rolle im Rahmen der embryonalen Organogenese, wobei er an der Entwicklung von Lunge, Oesophagus, Trachea und Darmrohr beteiligt ist (Mahlapuu *et al.*, 2001b). Eine Deletion von beiden Foxf1-Allelen in Mäusen führt dabei zu deren Tod während der Embryogenese (Mahlapuu *et al.*, 2001a) und verdeutlicht damit die entscheidende Bedeutung von Foxf1 im Rahmen der Organentwicklung. In der Leber wird Foxf1 ausschließlich in HSC exprimiert (Kalinichenko *et al.*, 2003) und trägt zur Aktivierung und Transdifferenzierung von HSC im Rahmen der Leberfibrosierung bei (Friedman, 2008; Kalinichenko *et al.*, 2002; Abshagen *et al.*, 2015a). Die fehlerhafte HSC-Aktivierung in Foxf1 haploinsuffizienten Mäusen nach CCl₄-Leberschädigung sowie die daraus resultierende abnorme Leberregeneration (Kalinichenko *et al.*, 2003) festigen die Bedeutung von Foxf1 als aktivierenden Transkriptionsfaktor. Durch gezieltes Foxf1-Gen-Silencing konnte in Mäusen mit Gallengangsligatur-induziertem Leberschaden das Voranschreiten der Leberschädigung verhindert und die Leberfibrose gemildert werden (Abshagen *et al.*, 2015a). Zusammenfassend lassen diese Ergebnisse schlussfolgern, dass Foxf1 ein mögliches Zielgen zur Unterbrechung des Fibrosierungsprozesses darstellen könnte (Abshagen *et al.*, 2015a).

3.1.5 Klinik

Die Bindegewebsvermehrung sowie der fortschreitende knotige Umbau des Leberparenchyms, der durch die oft über Jahre andauernde chronische Leberzellschädigung hervorgerufen wird, führen zur Zerstörung der normalen Leberläppchenarchitektur und beeinträchtigen deren Funktion. Dies hat oft erst nach Jahren den Ausfall

physiologischer Leberfunktionen wie Synthese, Exkretion und Biotransformation zur Folge und resultiert in den typischen klinischen Manifestationen der Leberzirrhose. Die in den ersten Jahren bestehende Beschwerdefreiheit im Stadium der Leberfibrose setzt sich in das Anfangsstadium der Leberzirrhose fort. Hierbei sind zunächst 20-30 % der Patienten beschwerdefrei oder klagen lediglich über Allgemeinbeschwerden wie Schwäche, rasche Ermüdbarkeit und Abgeschlagenheit (Alexander & Flasnöcker, 1999). Weitere häufig beschriebene unspezifische Beschwerden sind Verdauungsstörungen mit Meteorismus, Völlegefühl und Inappetenz. Die im Krankheitsverlauf entstehenden sowie bei fortgeschrittener Erkrankung bestehenden, zur Diagnostik dienenden, Leberhautzeichen sowie weitere Symptome sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Leberzirrhose-assoziierte klinische Symptome (modifiziert nach Rodés, 2007)

Symptome	Anmerkung
Palmarerythem	Auch bei Schwangerschaft, rheumatoider Arthritis und Leukämie möglich
Weißnägel	mit Albuminmangel assoziiert, der u.a. durch verminderte Syntheseleistung der Leber bedingt ist
Dupuytren Kontraktur	Häufig mit Alkoholabusus, dem häufigsten Auslöser der Leberzirrhose in Industrienationen, assoziiert
Flapping Tremor/ Asterixis	Folge der metabolischen (hepatischen) Enzephalopathie
Foetor hepaticus	Durch Leberinsuffizienz anfallende Metabolite gelangen über portokavale Anastomosen in die Lunge und verursachen den charakteristischen Geruch in der Ausatemluft
Ikterus	Die verminderte Bilirubinausscheidung führt zur Ablagerung von Bilirubin in Skleren und Haut. DD: u.a. cholestatische Lebererkrankungen
Kratzspuren	Die Bilirubinablagerung in der Haut führt zu massivem Pruritus

Gynäkomastie	Durch verminderten Östrogenabbau (eingeschränkte Metabolisierungsfunktion der Leber) bedingt
Hodenatrophie	Einerseits durch Hormonungleichgewicht andererseits durch möglichen Alkoholkonsum verursacht
Bauchglatze	Analog zur Gynäkomastie führt der erhöhte Östrogenspiegel zum Verlust der Sekundärbehaarung
Libidoverlust	Durch Hormonungleichgewicht im Rahmen der verminderten Östrogenabbaus bedingt
Menstruationsstörungen	Der erhöhte Östrogenspiegel bedingt sekundär eine Prolaktinsekretion, welche zu Zyklusveränderungen führt
Lacklippen	Durch atrophe ausgedünnte Haut wirken die Lippen rot-glänzend
Lackzunge	Durch Atrophie der Zungenpapillen, meist durch Vitamin-B12-Mangel bei Alkoholabusus, kommt es zu der charakteristisch rot glänzenden Zunge
Spider naevus	Charakteristische teleangiektatische Gefäßneubildung, die meist am Körperstamm lokalisiert ist
Caput medusae	Durch die portale Hypertension kommt es zum Blutrückstau in die eigentlich nicht sichtbaren Bauchhautvenen. Diese zeigen sich als geschlängelte, bläulich schimmernde Varizen der Bauchhaut

Oftmals erfolgt die Vorstellung der Patienten erst im Stadium der Dekompensation, welches durch Ikterus, Blutungsneigung, hepatische Enzephalopathie und portale Hypertension gekennzeichnet ist (Herold, 2011). Die portale Hypertension bedingt eine Reihe von weiteren Komplikationen wie Aszitesbildung, Splenomegalie sowie die Ausbildung gastroösophagealer Varizen, die bei der Hälfte der Leberzirrhosepatienten auftreten und Indikator für ein besonders schweres Krankheitsbild sind (Garcia-Tsao *et al.*, 2007). Die Blutung der gastroösophagealen Varizen stellt den häufigsten gastroenterologischen Notfall dar (Marshall *et al.*, 1977) und führt von allen gastrointestinalen Blutungen am häufigsten zum Tod (Garcia-Tsao *et al.*,

2007). Die Letalität ist dabei vom vorliegenden Child-Stadium (Child A bis C) abhängig. Während die Letalität bei Patienten mit Child-A Stadium unter 10% liegt, versterben 50% der Patienten im Stadium C bei erstmaligem Auftreten einer Varizenblutung (Herold, 2011). Die verminderte Lebersyntheseleistung mit resultierendem Gerinnungsfaktorenmangel sowie die im Rahmen des Hypersplenismus entstehende Thrombozytopenie tragen zusätzlich zur Schwere der Blutung bei und verkomplizieren das Krankheitsbild. Daneben ist die Leberzirrhose wie viele chronische Lebererkrankungen mit einer Reihe an weiteren Blutbildveränderungen assoziiert. Durch die verminderte Synthese von Albumin sinkt der Gesamteiweißanteil des Körpers deutlich. Es resultiert ein intravasal verminderter kolloidosmotischer Druck, der eine Flüssigkeitsextravasation ins Interstitium mit Ausbildung von Ödemen nach sich zieht. Der intravasale Flüssigkeitsverlust wird durch die Aszitesbildung massiv verstärkt und führt zur Organminderperfusion, was in der Niere mit einem Anstieg der Retentionsparameter einhergeht. Das akute Nierenversagen ist ein gängiges Krankheitsbild bei Patienten mit fortgeschrittener Zirrhose, wobei die lebensbedrohlichste Form durch das Hepatorenale Syndrom verursacht wird (Martín-Llahí *et al.*, 2011). Eine weitere schwere Komplikation, die mit einer mittleren Überlebenszeit von 24 Monaten einhergeht (Swanson *et al.*, 2005), stellt das hepatopulmonale Syndrom dar, welches durch die Trias aus Lebererkrankung, einem erhöhten alveolär-arteriellen Sauerstoffgradienten und einer Dilatation von intrapulmonalen Gefäßen charakterisiert ist (Rodriguez-Roisin *et al.*, 2004).

Als Spätfolge der Leberzirrhose stellt das HCC (Hepatozelluläre Karzinom) neben akutem Leberversagen und Varizenblutung die häufigste Todesursache in diesem Patientenkollektiv dar. In 80% der Fälle ist das HCC auf die Leberzirrhose zurückzuführen (Herold, 2011) und ist damit die fünfthäufigste Krebsart weltweit (El-Serag, 2012). Durch die hohe Inzidenz und die späte klinische Präsentation ist es weltweit die zweithäufigste krebsbedingte Todesursache (Stewart B, 2014), was das medizinische und sozioökonomische Problem dieser Erkrankung unterstreicht.

3.1.6 Therapie

Im klinischen Alltag beschränkt sich die Therapie der Leberzirrhose auf die Behandlung der zugrunde liegenden Erkrankung bzw. auf die Ausübung von Allgemeinmaßnahmen. An erster Stelle steht hier die Vermeidung der potenziellen Noxe. Neben striktem Alkoholverbot und dem Weglassen potenziell lebertoxischer Medikamente stellt die ausreichende Kalorien- und Eiweißzufuhr neben einer möglichen Vitaminsubstitution die Basistherapie dar. Abhängig von der Ätiologie kann eine spezifische Therapie der Grunderkrankung lediglich das Voranschreiten der Leberzirrhose verhindern. Der Versuch der Viruselimination bei chronischer Virushepatitis sowie die Immunsuppression bei Autoimmunhepatitis sind derzeit gängige Therapiestrategien. Die Eisenentfernung durch Aderlässe oder Chelatortherapie ist bei Hämochromatose ein etabliertes Verfahren. Beim M. Wilson, einer weiteren Stoffwechselerkrankung, steht die Elimination von Kupfer durch D-Penicillamin als Therapieoption zur Verfügung (Herold, 2011). Neben der Behandlung der Ursache und den supportiven Strategien steht abgesehen von der OLT (Orthotrope Lebertransplantation) bislang kein kuratives Verfahren zur Behandlung der Leberzirrhose zur Verfügung. Durch das Missverhältnis von potenziellen Organspendern und benötigten Organen sowie der mangelnden Eignung einiger Patienten für die OLT stellt auch dieses Verfahren keine zufriedenstellende Therapieoption zur Behandlung der Leberzirrhose dar.

Durch das zunehmende Verständnis pathophysiologischer Abläufe des Fibrosierungsprozesses wurden in den letzten Jahren einige Therapieoptionen entwickelt, die bereits präklinisch vielversprechende Ergebnisse zeigten. Die Gemeinsamkeit etlicher Therapieansätze lag in der Bestrebung, die HSC und deren Signalwege als therapeutischen Angriffspunkt zu adressieren. Die erzielten Erfolge stützen dabei die Bedeutung der HSC als Schlüsselzelle im Rahmen der Leberfibrosierung und machen sie als Ziel für zukünftige antifibrotische Strategien attraktiv (Friedman, 2008; Beljaars *et al.*, 2002; Abshagen *et al.*, 2015).

In der Vergangenheit konnte z.B. die Zufuhr von antifibrotischen Zytokinen wie IL-10 (Hung *et al.*, 2005) und IFN- γ (Bansal *et al.*, 2011; Bansal *et al.*, 2014), die verminderte Expression des profibrotischen Zytokins TGF- β 1 (Wang *et al.*, 2007) sowie dessen gezielte Blockade (Kondou *et al.*, 2003) eine Besserung der induzierten Fib-

rose in Mausmodellen bewirken. Weitere Ansätze nahmen spezifische Membranrezeptoren der HSC ins Visier und erzielten auf diesem Weg therapeutische Effekte (Li *et al.*, 2012; Gonzalo *et al.*, 2007). Neben Zytokinen und Membranrezeptoren konnten nukleäre Rezeptoren erfolgreich als Target adressiert werden. Exemplarisch ist hier der nukleäre Rezeptor PPAR γ zu nennen, welcher durch Adenovirus-vermittelten Gentransfer überexprimiert und damit eine Reduktion der induzierten Fibrose im Mausmodell erzielen wurde (Yu *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2013). Das in den beschriebenen Studien angewandte Wissen über die genetische Regulation der HSC, das bereits im Jahre 2000 durch Kristensen *et al.* maßgeblich vorangetrieben wurde und immer weiter vertieft werden konnte (Mann & Smart, 2002; Eng & Friedman, 2001; Rippe & Brenner, 2004), hat darüber hinaus weitere Ansätze hervorgebracht, welche die transkriptionale Regulation der HSC in den Fokus der antifibrotischen Therapie rückten (Siller-Lopez *et al.*, 2004; Atta *et al.*, 2014; Song *et al.*, 2016).

Trotz des gezeigten antifibrotischen Potenzials von etlichen Präparaten *in vitro* als auch in diversen Tiermodellen ist die Anwendung in klinischen Studien bislang begrenzt (Trautwein *et al.*, 2015). Dies liegt vor allem an der geringen therapeutischen Effektivität *in vivo* sowie den unerwünschten Nebeneffekten durch unspezifische Beeinflussung von Nicht-Zielzellen (Schon *et al.*, 2016; Poelstra *et al.*, 2013). Daher stellt die Zellspezifität in der Entwicklung neuer Therapieansätze eine der wichtigsten Punkte dar, um eine klinische Anwendung zu erreichen (Schon *et al.*, 2016). Dabei können Nanotechnologien und innovative Formulierungen, welche spezifisch HSC-exprimierte Rezeptoren adressieren, richtungsweisend sein (Schon *et al.*, 2016). Unabhängig von der bislang mangelnden klinischen Anwendbarkeit bleibt die Beeinflussung der transkriptionalen Regulation der HSC ein vielversprechender Ansatz der antifibrotischen Therapie.

3.2 siRNA

Die Epigenetik subsummiert alle Vorgänge, welche Einfluss auf die Genexpression nehmen, ohne die DNA-Struktur dabei zu verändern. Beispiele dafür sind die DNA-Methylierung, die posttranslationale Modifikation sowie die RNA-Interferenz (RNAi)

(Horn *et al.*, 2009). Letztere wurde bislang in allen eukaryontischen Lebewesen beobachtet, weshalb davon auszugehen ist, dass es sich hierbei um einen sehr alten entwicklungsgeschichtlichen Prozess handelt (Cerutti & Casas-Mollano, 2006). Im Rahmen der RNAi nimmt die small interfering-RNA, kurz siRNA, eine wesentliche Rolle ein. Diese Ribonukleinsäure-Moleküle sind doppelsträngig und mit einer Länge von 18-25 Nukleotiden relativ kurz. Durch Ribonukleaseaktivität des Enzyms Dicer werden siRNA-Moleküle aus 70 Nukleotide-langen RNA-Vorläufern synthetisiert und haben an ihrem jeweiligen 3'-Ende einen Überhang aus 2 Nukleotiden. Während die überstehenden 3'-Enden freie Hydroxygruppen tragen, sind die 5'-Enden phosphoryliert (Abb. 3).

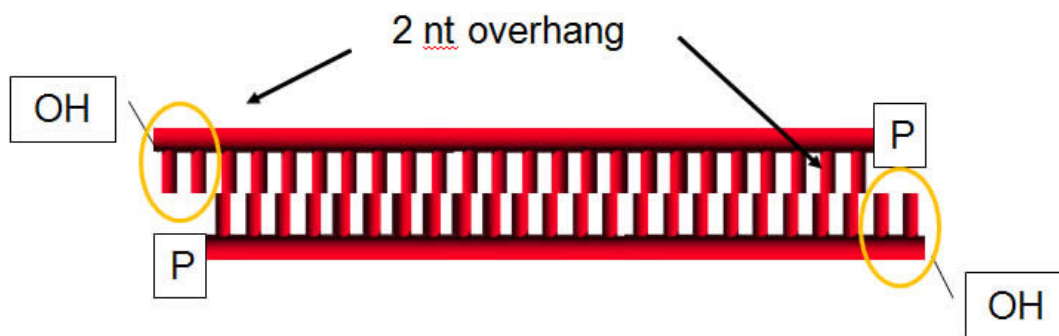


Abbildung 3: Schematische Darstellung eines siRNA-Moleküls (<http://www.novusbio.com/support/support-by-application/sirna/illustrated-assay.html> 21.03.2016)

Nach ihrer Synthese kann der Prozess der RNAi eingeleitet werden. Die neusynthetisierten doppelsträngigen siRNA-Moleküle binden an Argonautenproteine und werden durch deren enzymatische Aktivität in Einzelstränge gespalten. Der Leitstrang bleibt an das Argonautenprotein gebunden, während der ungebundene Strang abgebaut wird. Den entstandenen Komplex aus RNA, Argonautenprotein und weiteren angelagerten Proteinen nennt man RISC (RNA induced silencing complex). siRNA-vermittelt erfolgt die Bindung des RISC an die spezifische mRNA, da die Basenabfolge der siRNA komplementär zu ihrer Zielsequenz auf der mRNA ist. Nach dieser Bindung katalysiert das Argonautenprotein die Spaltung der mRNA, sodass diese nicht mehr als Matrice für die Proteinbiosynthese an den Ribosomen zur Verfügung steht. Die RNA-Interferenz kann auf diesem Weg die Bildung von

Proteinen verhindern und greift durch Gen-Knockdown bzw. Gen-Silencing in die Genexpression ein (Purves & Sadava, 2011; Fire *et al.*, 1998).

Unter physiologischen Bedingungen spielt das Silencing auch bei Pflanzen eine Rolle, da es der Abwehr von RNA-Viren dient und Bestandteil des pflanzlichen Verteidigungssystems ist. Auch bei Pilzen und Insekten existieren ähnliche Mechanismen der RNA-Interferenz zur Infektionsabwehr. Das Vorkommen eines siRNA-basierten Abwehrmechanismus in Säugetieren ist dagegen nicht gesichert (Haasnoot *et al.*, 2007).

Im Rahmen der Grundlagenforschung nutzt man das Prinzip der RNA-Interferenz, um die Funktion noch unbekannter Gene und deren codierende Proteine zu analysieren. Durch die Stummschaltung (Knockout/Knockdown) eines gewissen Gens und der damit verhinderten Proteinsynthese kann aus dem resultierenden Funktionsverlust die Wirkung des Proteins bzw. des kodierenden Gens abgeleitet werden. Somit stellt der zuverlässige Gen-Knockdown eine unerlässliche Technik der molekularbiologischen Forschung dar (Fakhr *et al.*, 2016). Gemessen an der Anzahl der Publikationen gehört die RNAi gemeinsam mit der Proteomik zu dem biotechnologischen Forschungsfeld mit der rasantesten Entwicklung (Taroncher-Oldenburg & Marshall, 2007). Neben der Grundlagenforschung gilt das Prinzip der RNAi in der Medizin als vielversprechende Therapieoption etlicher genetischer sowie erworbener Erkrankungen. Derzeit befinden sich mehr als 20 RNAi basierte Ansätze in klinischen Studien, wobei bereits einige in Studien der Phase 3 überführt werden konnten. Die erhobenen Daten und bisher erzielten Erfolge zeigen die enormen Möglichkeiten dieser Therapeutika und prophezeien eine vielversprechende klinische Zukunft des Silencings (Bobbin & Rossi, 2016).

3.3 DBTC-Formulierungen

Um den zielgerichteten Transport therapeutischer siRNA-Moleküle zu gewährleisten und deren vorzeitige Schädigung oder Abbau durch Nukleasen zu verhindern, wurden durch Silence Therapeutics GmbH (Berlin, Deutschland) Lipoplexe als Transportvesikel synthetisiert, die in unserer Studie aufgrund patentrechtlicher Mo-

difikationen den geschützten Begriff der „DBTC“-Formulierung tragen. Bei Lipoplexen handelt es sich generell um Komplexe aus Nukleinsäuren, wie in unserem Fall von therapeutischen Foxf1 siRNA-Molekülen, und einer Lipid- bzw. Polymerhülle (Abb. 4). Die doppelsträngigen siRNA-Oligonukleotide (AtuRNAi) wurden durch BioSpring (Frankfurt a.M., Deutschland) synthetisiert und durch Silence Therapeutics weiterverarbeitet. Durch Modifikation der siRNA-Moleküle im Vergleich zu endogenen, körpereigenen Typen wurde deren Stabilität deutlich erhöht. Die unter physiologischen Bedingungen am 3'-Ende überstehenden Nukleotide wurden durch 2'-O-Methylgruppen ersetzt und erlangten damit höhere chemische Stabilität gegenüber den vorhandenen Serum Nukleasen, ohne dabei die RNAi-Aktivität zu beeinträchtigen (Czauderna *et al.*, 2003). Die zur Synthese der Lipidhülle verwendeten kationischen Lipide lagern sich in mehreren Lipiddoppelschichten zusammen und schließen die negativ geladenen siRNA-Moleküle aufgrund der elektrostatischen Wechselwirkung ein, was sie *in vitro* als auch *in vivo* vor dem Abbau durch Nukleasen schützt (Fehring *et al.*, 2014). Die entstehenden Lipoplexe können durch das unterschiedliche Verhältnis von kationischen Lipiden und den negativen Nukleinsäuremolekülen sowie einer variierten Elektrolytkonzentration der Syntheselösung in ihrer Größe modifiziert werden. Durch spezifische Ladung und Größe dieser Lipoplexe kann eine spezifische Lieferung an unterschiedliche Gewebetypen realisiert werden. Für die in der vorliegenden Studie relevante Adressierung der HSC als Zielzelle wurden Formulierungen mit einer Größe von ca. 100 nm (Abb. 4) und einer neutralen Ladung hergestellt, da durch diese Charakteristik eine Leberspezifität erreicht werden kann (Abb. 4) (Abshagen *et al.*, 2015a). Durch den zusätzlichen Aufbau eines Polyethylenglykols (PEG) an den Lipoplex wird dessen Abbau durch das Mononukleäre-phagozytäre System stark vermindert und die Zirkulationszeit im Organismus maximiert (Immordino *et al.*, 2006). Dies ermöglicht die Reduktion der Applikationsdosis und verringert potenzielle Wechselwirkungen. Die Lipoplexe werden nach systemischer Applikation durch Endozytose in die Zielzelle aufgenommen und persistieren vorerst in Endosomen (Lu *et al.*, 2009). Um das Gen-Silencing einzuleiten, wird das singuläre siRNA-Molekül jedoch im Zytoplasma benötigt. Die Freisetzung aus dem Endosom erfolgt durch elektrostatische Wechselwirkungen. Durch

einen Flip-Flop-Mechanismus gelangen kationische Lipide der Endosomenmembran in die Lipoplexmembran und ermöglichen durch Porenbildung die Freisetzung der therapeutischen Nukleinsäure ins Zytoplasma (Rehman *et al.*, 2013).

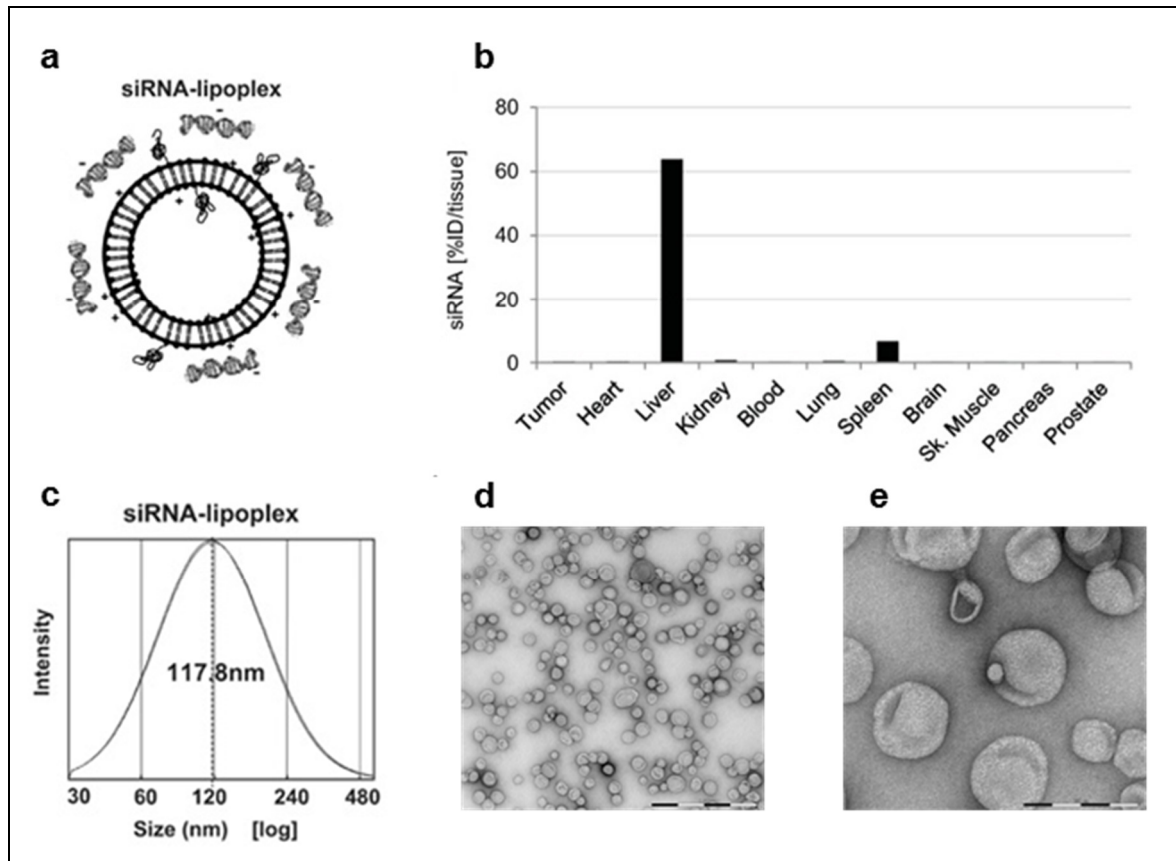


Abbildung 4: Physikochemische Eigenschaften der DBTC-siRNA-Lipoplexe. (a) Schematischer Aufbau eines siRNA-Lipoplexes, (b) *in vivo* Organverteilung der DBTC-Lipoplexe nach systemischer Applikation. (c) Partikelgröße eines Vorläufer-Lipoplexes. (d) und (e) Elektronenmikroskopische Aufnahmen von DBTC-Lipoplexen (modifiziert nach (Santel *et al.*, 2006; Abshagen *et al.*, 2015a; Fehring *et al.*, 2014)).

3.4 Zielsetzung

Ziel dieser tierexperimentellen Studie war zu überprüfen, inwieweit sich das durch Abshagen *et al.* (2015) untersuchte hepatoprotektive Potenzial eines Foxf1-Silencing im Modell der cholestatischen bzw. BDL-induzierten Leberschädigung auf Modelle des CCl₄-induzierten akuten und chronischen Leberschadens übertragen lässt.

Um das Ausmaß der Leberschädigung zu evaluieren und potenzielle therapeutische Effekte nachzuweisen, wurden verschiedene laborchemische, histologische, immunhistochemische sowie molekularbiologische Verfahren angewandt.

Folgende Fragestellungen wurden im Rahmen dieser Studie untersucht:

- Kann durch die Applikation von DBTC-Foxf1-siRNA ein Knockdown des Zielgens Foxf1 im Modell der akuten und chronischen CCl₄ Leberschädigung erreicht werden?
- Ist durch Gen-Silencing des aktivierenden Transkriptionsfaktors Foxf1 eine Inhibition der Aktivierung der HSC *in vivo* möglich?
- Welchen Einfluss hat die siRNA-vermittelte Hemmung der Foxf1-Expression auf den CCl₄-induzierten akuten Leberschaden?
- Welchen Einfluss hat die siRNA-vermittelte Hemmung der Foxf1-Expression auf den CCl₄-induzierten chronischen Leberschaden bzw. die Leberfibrose?

4 Material und Methoden

4.1 Versuchstiere

Für die Untersuchungen wurden männliche, 12-16 Wochen alte BALB/c Mäuse mit einem Körpergewicht von 23 bis 32 g verwendet. Der für die Studie genutzte Mausstamm wurde aus der Zucht von Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland, bezogen. Vor und während der Untersuchungen wurden die Tiere in einem klimatisierten Raum (Temperatur 22 bis 24°C, ca. 60% Luftfeuchtigkeit) bei einem 12 h Tag-Nacht-Rhythmus in der Zentralen Versuchstierhaltung des Instituts für Experimentelle Chirurgie der Universitätsmedizin Rostock gehalten. Während des gesamten Zeitraums wurden die Tiere mit Standardlaborfutter (Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) und Wasser ad libitum versorgt. Die Einhaltung der nationalen Tierschutzbestimmungen, der internationalen Richtlinien (*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals; National Institutes of Health publication 86-23, Revised 1985*) sowie der Nutzerordnung der Zentralen Versuchstierhaltung der Universitätsmedizin Rostock, unter der Kontrolle des Tierschutzbeauftragten PD Dr. rer. nat. Dietmar Zechner, war zu jedem Zeitpunkt der Studie gewährleistet.

4.2 Praktische Anwendung

4.2.1 CCl₄ Applikation

Zur Induktion eines akuten und chronischen Leberschadens nutzen wir das gängige und seit Jahren etablierte Schädigungsmodell der intraperitonealen Tetrachlorkohlenstoff (CCl₄)-Injektion. Die resultierende Aktivierung des hepatischen Cytochroms P450 hat eine Metabolisierung von CCl₄ zu toxischen Metaboliten zur Folge, was Parenchym- und Lebervenennekrosen nach sich zieht (Morrison *et al.*, 1965). Das Isoenzym P450 2E1, welchem die Hauptfunktion bei der Metabolisierung zugeschrieben wird (Raucy *et al.*, 1993), ist hauptsächlich in perizentral gelegenen Hepatozyten lokalisiert und verursacht somit hier die ausgeprägtesten Leberzellnekrosen (Diaz Gómez *et al.*, 2006). In Vorbereitung auf die intraperitoneale Injektion von CCl₄ (Merck, Darmstadt, Deutschland) wurde für das akute Modell eine Verdünnung von 1:20 in Kornöl (Sigma-Aldrich, Steinheim,

Deutschland) gewählt, während wir im chronischen Modell CCl₄ 1:4 in Kornöl verdünnten. Zur intraperitonealen Applikation wurden die Tiere aus den Käfigen entnommen und mittels Pinzettengriff im Nacken fixiert. Die 26 G Injektionsnadel einer 1 ml Insulinspritze (BD Microlance, Drogheda, Irland) wurde im Übergang vom distalen zum mittleren Drittel des Abdomens, in einem Winkel von ca. 30° mit kranialer Stichrichtung, auf der rechten Seite des Tieres paramedian eingeführt, und das CCl₄-Öl-Gemisch (akutes Modell: 0,5 µl/g KG; chronisches Modell: 1 µl/g KG) appliziert.

4.2.2 Anästhesie

Vor der i.v.-Applikation der DBTC-Formulierungen wurden die Tiere mittels Inhalationsnarkose anästhesiert. Hierfür wurde in eine Narkosekammer aus Plexiglas über eine Zuleitung ein Gasgemisch aus Sauerstoff (1,2 l/min), Stickstoffmonoxid (2,4 l/min) und Isofluran (5 % vol.) eingeleitet. Die Tiere wurden dem Gasgemisch für ca. 30 sec. bis zum Eintreten der Bewusstlosigkeit ausgesetzt. Im Anschluss wurden sie auf einer Wärmeplatte platziert und erhielten über eine speziell angefertigte Kunststoffmaske weiterhin das Gasgemisch in reduzierter Konzentration (O₂ 0,4 l/min, N₂O 0,8 l/min, Isofluran 1,5 % vol.). Das überschüssige sowie abgeatmete Gas wurde über eine Vorrichtung, die in die Kunststoffmaske integriert war, abgesaugt. Vor der Gewebe- und Blutentnahme und der damit verbundenen Opferung der Versuchstiere zu den finalen Untersuchungszeitpunkten narkotisierten wir diese durch eine intraperitoneale Injektion. Es wurde ein Gemisch aus 65 mg/kg KG Ketamin (Betapharm GmbH & Co. KG, Vechta, Deutschland) und 25 mg/kg KG Xylazin (Rompun®, Bayer Vital GmbH, Bayer Health Care, Deutschland) in einer Dosierung von 0,01 ml/10 g KG appliziert.

4.2.3 Intravenöse Applikation der DBTC-Formulierungen

Nach Durchführung der Inhalationsanästhesie entfernten wir die Haare im Hals- und Brustbereich durch eine Elektrorasur (AESCULAP® Favorita, Aesculap AG & Co. KG Tuttlingen, Deutschland). Im Anschluss wurde das Tier in Rückenlage auf einer Heizplatte (Klaus Effenberger, Pfaffing, Deutschland) fixiert, um die Aufrechterhaltung der Körpertemperatur von 37°C zu gewährleisten. Nach lokaler Desinfektion erfolgte eine kutane Längsinzision (ca. 0,5-1 cm) der rechten Halsseite. Mit Hilfe eines Stereomikroskops (Leica M651/M655, Leica Microsystems AG, Heerbrugg, Schweiz) konnte unter Blickfeldvergrößerung die rechte V. jugularis durch stumpfe Präparation dargestellt werden. Die zuvor gelösten DBTC-Formulierungen wurden nun durch Punktion der V. jugularis in kaudaler Stichrichtung vorsichtig appliziert (2.3 mg/kg KG; 0.1 ml/10 g KG). Die sich anschließende Sickerblutung wurde durch Auflage eines Stieltupfers (Lohmann & Rauscher, Regensburg, Deutschland) gestillt. Im Anschluss wurde die Wunde mittels Hautnaht (Prolene 6.0, Ethicon, Johnson & Johnson Medical, Norderstedt, Deutschland) in fortlaufender Nahttechnik verschlossen. Es erfolgte eine abschließende Desinfektion der Wunde mit Povidon-Iod. Die Tiere wurden zurück in ihre Käfige gebracht, wo sie vorübergehend Rotlichtbestrahlung ausgesetzt waren, um sie vor Auskühlung zu bewahren. Während des gesamten Vorgangs wurde die Narkose, wie in Kapitel 4.2.2 beschrieben, aufrechterhalten.

4.2.4 Blut- und Gewebeentnahme

Um zu den finalen Untersuchungszeitpunkten Blutproben und Lebergewebe für die Analysen zu erhalten, erfolgte die Anästhesie wie in Kapitel 4.2.2 dargestellt. Nach Elektrorasur des Bauches wurden die Tiere in Rückenlage fixiert und lokal mit Ethanol desinfiziert. Im Anschluss erfolgte eine mediane Laparotomie sowie ein zusätzlicher Transversalschnitt im Unterbauch, um die Haut zur besseren Darstellung des Bauchraumes nach lateral zu fixieren. Mit einem feuchten Watetupfer wurden die Darmschlingen nach lateral luxiert, um eine gute Darstellung der unteren Hohlvene zu gewährleisten. Durch Punktion der V. cava inferior und

vorsichtige Aspiration gewannen wir circa 1 ml Vollblut und überführten es zur späteren Analyse in Ca^{2+} -EDTA-Röhrchen. Zur Präparation der Leber wurden die Haltebänder zu Magen, Zwerchfell und Retroperitoneum durchtrennt und die Leber durch sanften Zug vorsichtig aus dem Oberbauch geschnitten. Im Anschluss wurde das Gesamtlebergewicht bestimmt. Der linke Leberlappen wurde abpräpariert und in 4%igem, phosphatgepuffertem Formalin (Grimm med. Logistic, Torgelow, Deutschland) für mindestens 24 h fixiert. Ein Teil der Leber wurde in Gewebekleber (Tissue-Tek; Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, Niederlande) eingebettet, durch Flüssigstickstoff schockgefroren und im Anschluss bei -20°C in Alufolie asserviert. Die restlichen Leberlappen wurden zerkleinert, in Mikro-Schraubenröhren (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) überführt, in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80°C für nachfolgende molekularbiologischen Analysen asserviert.

4.3 Versuchsaufbau

4.3.1 Akutes CCl_4 Modell

Die Randomisierung der BALB/c Mäuse erfolgte in drei Gruppen. Die Therapiegruppe (siFoxf1 $n=9$) sowie zwei Kontrollgruppen, siLuci ($n=8$) und Puffer ($n=5$) wurden anhand des Schemas in Abbildung 5 behandelt. Die intravenöse Applikation der DBTC-Foxf1 siRNA (2.3 mg/kg KG; 0,1 ml/10 g KG) in der Therapiegruppe erfolgte 48 h vor der intraperitonealen CCl_4 -Applikation (CCl_4 1:20 in Kornöl; 0,5 μl / g KG i.p.) (Kalinichenko *et al.*, 2003) und einmalig 24 h nach CCl_4 -Gabe. 72 h nach CCl_4 -Applikation wurden die Tiere geopfert, um Blut- und Gewebeproben für nachfolgende Untersuchungen zu asservieren. Die Behandlung der Kontrollgruppen erfolgte analog zu dem beschriebenen Schema, welches in der Therapiegruppe angewendet wurde. Dabei wurde den Tieren der Gruppe si-Luci, als Kontrollansatz eine nonsense-siRNA gegen das Luciferase-Gen, in äquivalenter Dosis zur Therapiegruppe (2.3 mg/kg KG; 0,1 ml /10 g KG) intravenös appliziert. Die Verabreichung der Pufferlösung der zweiten Kontrollgruppe erfolgte ebenfalls intravenös in äquivalenten Volumina (0,1 ml /10 g KG).

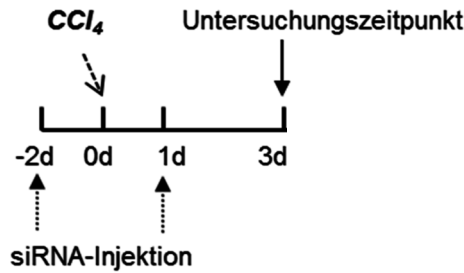


Abbildung 5: Versuchsaufbau im Modell der akuten CCl₄-Leberschädigung über 3 Tage.

4.3.2 Chronisches CCl₄ Modell

Analog zum akuten Modell erfolgte die Randomisierung in drei Gruppen. Die Behandlung der Therapiegruppe siFoxf1 (n=5) sowie der Kontrollgruppen siLuci (n=7) und Puffer (n=5) erfolgte anhand des in Abbildung 6 dargestellten Schemas. Die intraperitoneale Applikation von Tetrachlorkohlenstoff (CCl₄ 1:4 in Kornöl; 1 µl/g KG) erfolgte zweimal wöchentlich (montags und donnerstags) über eine Dauer von sechs Wochen. In Woche fünf und sechs erhielten die Tiere zusätzlich die fünfmalige intravenöse Applikation von DBTC-Foxf1/Luci siRNA (2.3 mg/kg KG; 0,1 ml /10 g KG) im Abstand von 72 h. Die Applikation der Pufferlösung in der Puffer-Kontrollgruppe erfolgte in äquivalenten Volumina (0,1 ml /10 g KG, i.v.).

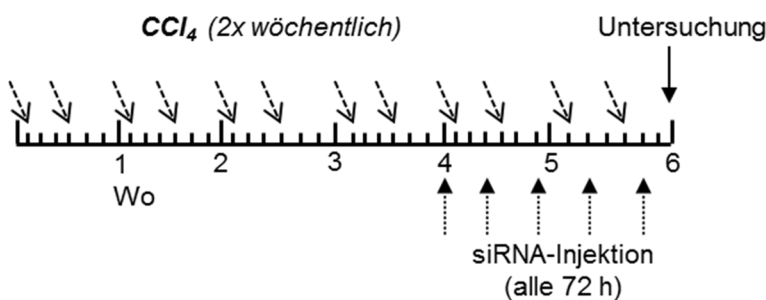


Abbildung 6: Versuchsaufbau im Modell der chronischen CCl₄-Leberschädigung über 6 Wochen.

4.4 Untersuchungstechniken

4.4.1 Vollblutanalyse

Unmittelbar im Anschluss an die finalen Blut- und Gewebeentnahmen wurden die in Ca^{2+} -EDTA-Röhrchen überführten Vollblutproben durch den automatischen Hämatologie-Analysator (Sysmex KX-21 N, Sysmex, Norderstedt) ausgewertet. Dabei wurden die Parameter der roten Blutzellreihe wie Erythrozytenzahl, Hämatokrit und Hämoglobinwert sowie die absolute Leukozyten- und Thrombozytenzahl bestimmt. Das in den Röhrchen verbleibende Probenmaterial wurde im Anschluss für 10 min bei 4000 rpm zentrifugiert (GS15 Zentrifuge, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland), der Überstand abpipettiert und das Plasma bei -20°C bis zur Analyse asserviert.

4.4.2 Plasmaanalyse

Die auch im klinischen Alltag gebräuchliche Enzymdiagnostik zur Beurteilung einer Leberschädigung wurde in der vorliegenden Studie mittels automatisierter photospektrometrischer Analyse (Hitachi 7004 Automatic Analyser, Boehringer, Mannheim, Deutschland) realisiert. Es erfolgte die Bestimmung der leberspezifischen Enzyme GLDH (Glutamatdehydrogenase) und ALT (Alanin-Aminotransferase) als auch der leberunspezifischen Enzyme AST (Aspartat-Aminotransferase) und AP (Alkalische Phosphatase).

4.4.3 Histologie

4.4.3.1 Hämatoxylin- Eosin

Im Anschluss an die mindestens 24-stündige Fixierung des Lebergewebes in Formalin wurde das Präparat in aufsteigender Alkoholreihe entwässert und schließlich in Paraffinwachs (Merck, Darmstadt, Deutschland) eingebettet. Danach wurden mit Hilfe eines Mikrotoms (Leica RM 2145, Wetzlar, Deutschland)

4 µm dünne Gewebeschnitte angefertigt und auf Objektträgern fixiert. Anschließend wurden diese für 30 min bei 65 °C inkubiert und das Gewebe durch Einbringen in Alkohollösungen entparaffiniert. Vor der Färbung führten wir eine Waschung mit PBS durch. Nun wurden die Objektträger 5 min in Hämalaun-Lösung (Merck, Darmstadt, Deutschland) inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine Waschung mit fließendem Wasser für 30 s und PBS, bevor im nächsten Schritt das Gewebe für 30 s in einer Eosin-Lösung inkubiert wurde. Es schloss sich ein weiterer Waschgang mit Wasser und PBS an, bevor abschließend das Präparat mit reinem Alkohol dehydriert und eine Deckplatte auf das Objekt aufgebracht wurde. Durch den Hämalaun-Farbstoff stellen sich die Zellkerne blau dar, während Eosin das Zytoplasma rötlich-violett anfärbt. Zellschädigungen ließen sich lichtmikroskopisch visualisieren (x10 Vergrößerung, Olympus BX 51, Hamburg, Deutschland) und mittels Color View II FW Kamera (Color View, München, Deutschland) fotodokumentieren (Abb. 7 A). Mit Hilfe der Software Adobe Photoshop CS6 wurden die fibrotischen Areale histomorphometrisch berechnet (Abb. 7 B), die Daten in Microsoft Excel Tabellen übertragen und ausgewertet. Die Anfertigung der H.E. Schnitte erfolgte ausschließlich aus dem Lebergewebe von Tieren des akuten CCl₄-Modells.

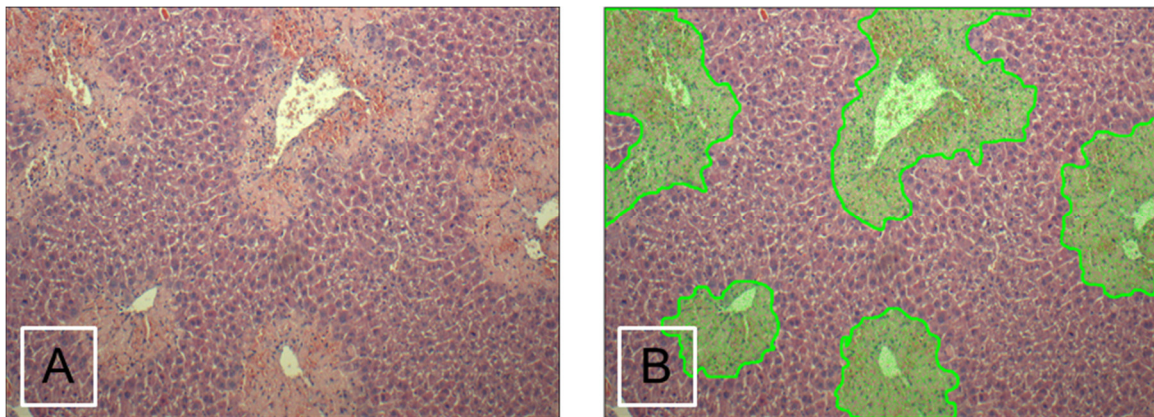


Abbildung 7: Histomorphometrische Auswertung der Nekroseareale in einem H.E.-gefärbten Leberschnitt einer Maus 3 Tage nach CCl₄-Injektion des akuten CCl₄-Modells. Dargestellt ist ein 10-fach vergrößerter Leberschnitt vor (A) und nach histomorphometrischer Analyse mittels Photoshop (Lasso-Werkzeug) (B). Zur Berechnung der Nekrose (in %) wurde die Pixelanzahl der Nekroseareale (grüne Fläche) ins Verhältnis zur Gesamtpixelzahl des Bildes gesetzt.

4.4.3.2 Immunhistochemie

α -SMA

Immunhistochemie ist eine in der Biologie und Medizin verwendete Methode, mit der Proteine oder andere Strukturen mit Hilfe von Antikörpern sichtbar gemacht werden können (Lang, 2013). Durch die immunhistochemische Färbung von α -SMA, einem etablierten Aktivierungsmarker der HSC (Lindquist *et al.*, 2000), können damit Rückschlüsse auf die Leberfibrosierung geschlossen werden. Um die α -SMA-Färbung durchzuführen, wurden mit Hilfe des Mikrotoms (Leica RM 2145, Wetzlar, Deutschland) 4 μ m dünne Paraffinschnitte angefertigt, auf poly-L-Lysin beschichtete Objektträger aufgebracht und letztlich 2 h im Brutschrank inkubiert. Da die Formalinfixierung zu Proteinvernetzungen im Gewebe führt, wurde das Gewebe zuvor entparaffiniert und die Antikörperbindungsstellen durch Hitzedenaturierung freigelegt. Die unspezifischen Bindungsstellen wurden mit Hilfe einer Blockierungslösung blockiert, bevor mit dem α -SMA-Primärantikörper (1:600, Rabbit Anti Mouse, AB5694, Abcam plc, Cambridge, UK) bei 4 °C über Nacht inkubiert wurde. Danach erfolgte eine Waschung mit PBS, bevor im nächsten Schritt ein Sekundärantikörper (1:100, Goat Anti Rabbit, DO487, Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) aufgebracht und für 1 h inkubiert wurde. Anschließend erfolgte eine erneute Waschung mit PBS. Um den Sekundärantikörper sichtbar zu machen, wurde mit Liquid Permanent Red Chromogen (KO640, Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) gegengefärbt und im Anschluss erneut mit PBS gewaschen. Zusätzlich erfolgte eine Kernfärbung mittels Hämalalaunlösung (Merck, Darmstadt, Deutschland). Nach wiederholter PBS-Waschung wurde das Gewebe mit warmen Leitungswasser „gebläut“ und anschließend in aufsteigender Alkoholreihe dehydriert. Abschließend wurde das Gewebe mit X-tra-Kitt eingedeckt, um es haltbar zu machen. Die rot angefärbten α -SMA-positiven Sternzellen wurden mit dem Lichtmikroskop (Olympus BX 54 TF, Olympus Corporation, Tokyo, Japan) in 40x Vergrößerung ausgewertet, wobei pro Tier/Lebergewebeschnitt 30 Gesichtsfelder ausgezählt wurden. Die Werte wurden in Microsoft Excel-Tabellen übertragen und letztlich mit Sigma Plot in Balkendiagramme überführt. Die quantitative Analyse der α -SMA-positiven Zellen erfolgte sowohl im akuten als auch im chronischen CCl₄-Modell.

Kollagen-1 α

Die Kollagen-1 α -Färbung wurde analog zur beschriebenen α -SMA-Färbung durchgeführt, wobei als Primärantikörper ein Rabbit anti Mouse-AK (Rabbit Anti Mouse, 34710; Abcam, Cambridge, UK) in einer Verdünnung von 1:200 eingesetzt wurde. Als Sekundärantikörper verwendeten wir einen Goat Anti Rabbit-AK (1:100, DO448, Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland). Die Gegenfärbung erfolgte mittels DAB and DAB plus Chromogen Solution (K3467, Dako Deutschland GmbH, Hamburg Deutschland). Zur Auswertung des braun gefärbten Kollagen-1 α positiven Gewebes wurden pro Tier 30 Bilder in 10-facher Vergrößerung aufgenommen und mit Adobe Photoshop histomorphometrisch analysiert (Abb. 8). Die Ergebnisse wurden in Excel Tabellen überführt, die Mittelwerte pro Gruppe berechnet und die Resultate mit SigmaPlot in Balkendiagrammen dargestellt. Die Auswertung Kollagen-1 α -positiver Fläche erfolgte ausschließlich im Lebergewebe von Tieren des chronischen CCl₄-Modells.

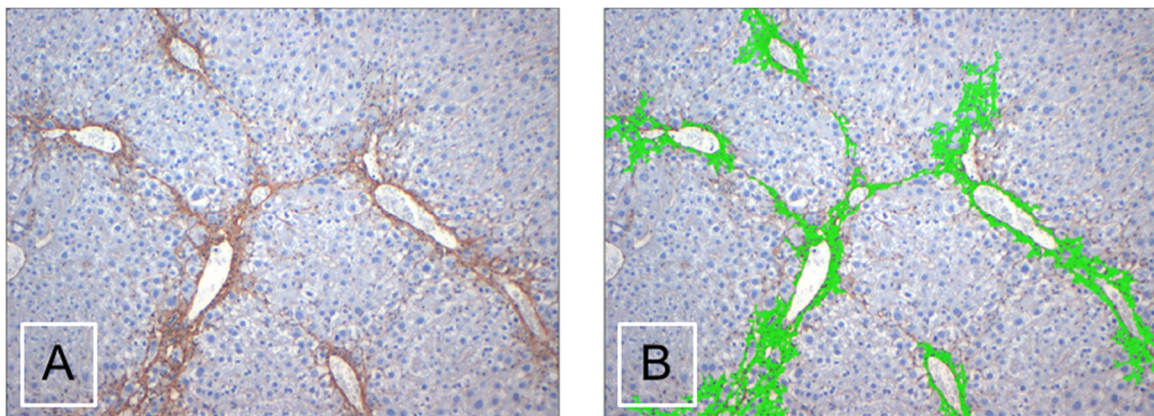


Abbildung 8: Histomorphometrische Auswertung der Kollagen-1 α positiven Fläche in einem immunhistochemisch gefärbten Leberschnitt einer Maus nach 6-wöchiger CCl₄-Behandlung. Dargestellt ist ein 10-fach vergrößerter Leberschnitt vor (A) und nach histomorphometrischer Analyse mittels Photoshop (Zauberstab-Werkzeug) (B). Die Pixelanzahl der Kollagen-1 α positiven Fläche (grüne Fläche) wurde im Verhältnis zur Gesamtpixelzahl des Bildes in Prozent dargestellt.

4.4.4 Molekularbiologie

Um die Expression bestimmter Gene in biologischen Materialien zu untersuchen, nutzt man die Quantifizierung der mRNA, bevor im Rahmen der Translation das

entsprechende Protein synthetisiert wird. Das molekularbiologische Kombinationsverfahren aus Reverser Transkription (RT) und Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht die mRNA-Genexpressionsanalyse zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme. In der vorliegenden Studie untersuchten wir die mRNA-Expression von Foxf1, dem aktivierenden Transkriptionsfaktor für HSC sowie die Expression von Kollagen-1 α als Marker für die Fibrosierung. 30 mg des schockgefrorenen und bei -80 °C gelagerten Lebergewebes wurden mit Hilfe eines Dismembrators (Mikro-Dismembrator U, B. Braun Biotech International, Deutschland) homogenisiert, bevor die RNA mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) gemäß der Herstellerangaben isoliert wurde. Mit einem Spektralphotometer (Nanodrop 2000 Spectrophotometer, PegLab Biotechnologie GmbH, Deutschland) wurde die Konzentration der isolierten RNA UV-spektrophotometrisch vermessen und anhand nachfolgender Formel berechnet, um für die Analysen die Verwendung gleicher RNA-Mengen zu gewährleisten:

$$\text{RNA Konzentration}(\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \frac{\text{Extinktion } 260\text{nm} \times \text{Verdünnung} \times 40}{1000}$$

Zusätzlich wurde die Reinheit der RNA anhand des A260/A280 Quotienten bestimmt. Es wurden je 2 μg RNA genutzt, um mit Hilfe von Oligo(dT)18-Primer (Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland), Superscript II RNaseH - Reverse Transkriptase (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), dNTP Mix (Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham MA, USA), Puffer und Dithiothreitol die komplementären cDNA-Stränge der RNA zu gewinnen. Die Synthese der cDNA wurde mit Hilfe des Programms RNADENAT (72°C für 10 min) bzw. RT 42 (42°C für 60 min gefolgt von 95°C für 5 min) im Mastercycler (Mastercycler gradient, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland) durchgeführt. Die TaqMan RT-PCR Reaktionen wurden mit Hilfe eines ABI PRISM 7700 Sequence Detector (Software: Sequence Detection System v1.6.3 (ABI)) oder dem StepOnePlus™ Real Time PCR System (ABI) unter Nutzung von Standardprotokollen für RT-PCR (48°C 30 min, 95°C 10 min, 40 cycles at 95°C 15 s followed by 60°C 1 min) mit Konzent-

rationen von 300 nM für die Primer (Tab. 2) und 100 nM für die Probe durchgeführt (Fehring *et al.*, 2014). Die ausgegebenen CT-Werte, die von der Software ermittelt wurden, wurden mit Hilfe der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode ausgewertet. Dabei wurde beachtet, dass eine Primereffizienz von nahezu 100% (d.h. 1,9-2,2) vorliegt. Zur Qualitätskontrolle erfolgten von jeder Probe Doppelbestimmungen. Die erhaltenen Ergebnisse wurden mit der ΔCT -Methode gegenüber β -Aktin normalisiert. Aus den berechneten ΔCT -Werten jeder Probe und dem ΔCT -Wert der Positivkontrolle wird der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Wert gebildet. Die Ergebnisse wurden zur graphischen Veranschaulichung mit SigmaPlot in Balkendiagramme überführt.

Tabelle 2: Primersequenzen für die TaqMan RT-PCR.

Gen	Primer	Sequenz (5' zu 3')
Foxf1	vorwärts rückwärts Sonde	GCAGCCATACCTTCACCAAAAC ACATGCTGGGCGACTGTGA AGAACTGCAAGGCATCCCTCGGTATCAC
Kollagen-1- α	vorwärts rückwärts Sonde	ACGCATGGCCAAGAAGACA AAGCATACCTCGGGTTTCCAC AGCTGCATACACAATGGCCTAAGGGTCC
β -Aktin	vorwärts rückwärts Sonde	GTTTGAGACCTTCAACACCCCA GACCAGAGGCATACAGGGACA CCATGTACGTAGCCATCCAGGCTGTG

4.4.5 Statistik

Zur Berechnung von Mittelwerten, Standardabweichung (SD) und Standardfehler der Mittelwerte (SEM) wurden die ermittelten Primärdaten direkt in Microsoft Excel-Tabellen überführt. Die Darstellung der numerischen Ergebnisse als graphische Diagramme erfolgte mit Hilfe der Software SigmaPlot 12.0 (Jandel Corp., San Rafael, CA, USA). Alle Daten wurden als Mittelwert \pm Standardfehler des

Mittelwertes (SEM) dargestellt. Die statistische Analyse der erhobenen Daten nahm die Software SigmaStat 3.5 (Jandel Scientific, San Rafael, CA, USA) vor. Der Gruppenvergleich wurde mit einer einfaktoriellen ANOVA-Analyse (Holm-Sidak Methode) realisiert. Konnten die Kriterien für eine Normalverteilung nicht erfüllt werden, kam der einfaktorielle Anova on Ranks-Test (Dunn's Methode) zur Anwendung. Ein statistisch signifikanter Unterschied galt dann als erfüllt, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit weniger als 5% ($p < 0,05$) betrug.

5 Ergebnisse

5.1 Akutes CCl₄ Modell

5.1.1 Zustand der Tiere

Um den Zustand der Tiere besser beurteilen zu können, wurden vor Applikation der siRNA-Lipoplexe (Tag -2 und 1), vor der CCl₄-Applikation (Tag 0) sowie vor Opferung der Versuchstiere (Tag 3) Gewichtskontrollen der Tiere durchgeführt. Hierbei zeigte sich eine stetige, jedoch geringe Gewichtsabnahme in allen untersuchten Gruppen. Am Tag der Gewebeasservierung (Tag 3) betrug das Gewicht der Puffer-Kontrollgruppe $94\% \pm 5,6\%$, der siLuci Gruppe $94,7\% \pm 2,2\%$ und der Therapiegruppe siFoxf1 $97,1\% \pm 1,9\%$ des Ausgangsgewichts. Die Beurteilung der körperlichen Aktivität im Rahmen der täglichen Visite zeigte eine deutliche Reduktion im Anschluss an die i.p. CCl₄-Injektion (Tag 0). Während die Tiere beim Erwachen aus der Narkose an Tag -2 keine pathologischen Auffälligkeiten zeigten, waren die Aufwachphasen an Tag 1 deutlich verlängert und die Tiere zeigten auch an Tag 1 eine deutlich reduzierte körperliche Aktivität. Bei zwei Mäusen hatte die CCl₄-Applikation in den Folgestunden einen letalen Ausgang. Weitere Mäuse (n=4) verstarben im Rahmen der Narkose am darauf folgenden Tag und wurden daher ebenfalls aus der Studie exkludiert.

5.1.2 Foxf1-Silencing

Wie bereits erwähnt, spielt Foxf1 als ein aktivierender Transkriptionsfaktor eine entscheidende Rolle für die Aktivität der HSC. Zuerst wurde die Effizienz des Gen-Silencing durch die Foxf1-siRNA mittels RT-PCR analysiert. Dabei zeigte sich, dass die Behandlung der Mäuse mit DBTC-siFoxf1 2 Tage vor und 1 Tag nach der einmaligen CCl₄-Gabe im Vergleich zu den Kontrollgruppen in einer reduzierten Foxf1 mRNA-Expression resultierte, welche im Vergleich zu Puffer-behandelten Tieren signifikant war (Abb. 9).

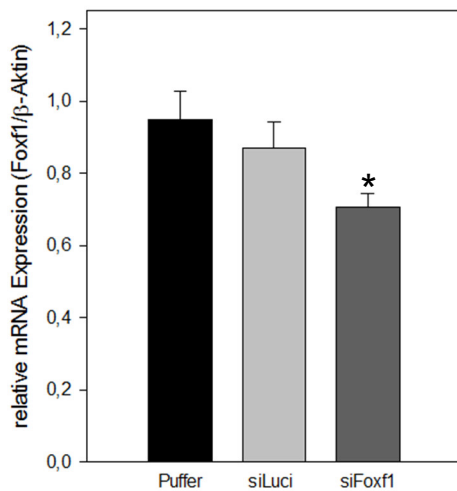


Abbildung 9: Relative Expression der Foxf1-mRNA im Lebergewebe der Kontrollgruppen (Puffer & siLuci) sowie der Therapiegruppe (siFoxf1) 3 Tage nach Induktion eines akuten Leberschadens. Alle Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben; One way ANOVA; * $p < 0,05$ vs. Puffer.

5.1.3 Vollblutanalyse

Akute Lebererkrankungen gehen sehr häufig mit Veränderungen im Blutbild, v.a der weißen Blutzellreihe, einher. Zur Überprüfung des Blutbildes führten wir im akuten CCl_4 Modell an Tag 3 eine Vollblutanalyse durch. Die quantitative Bestimmung der Leukozyten, Erythrozyten sowie des Hämoglobinwertes und Hämato-krit ergab in allen Gruppen (Puffer, siLuci, siFoxf1) physiologische Werte und keine markanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Bei der quantitativen Bestimmung der Thrombozyten wiesen alle untersuchten Gruppen deutliche Zytopenien auf. Die Therapie mit Foxf1-siRNA zeigte im Vergleich zu den Kontrollgruppen eine leichte Minderung der Thrombozytopenie auf 2/3 des unteren physiologischen Grenzwertes (Tab. 3).

Tabelle 3: Leukozytenzahl (WBC), Thrombozytenzahl (PLT), Erythrozytenzahl (RBC), Hämoglobinwert (HGB) und Hämatokrit (HCT) der Kontrollgruppen (Puffer u. siLuci) sowie der Therapiegruppe (siFoxf1) 3 Tage nach Induktion eines akuten Leberschadens. Alle Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben.

	Puffer	siLuci	siFoxf1
WBC ($\times 10^9/l$)	$6,5 \pm 0,8$	$7,9 \pm 1,3$	$6,3 \pm 0,5$
PLT ($\times 10^9/l$)	$512 \pm 115,7$	$461 \pm 56,2$	$686,6 \pm 76,8$
RBC ($\times 10^{12}/l$)	$9,1 \pm 0,5$	$8,4 \pm 0,4$	$8,3 \pm 0,4$
HGB (mmol/l)	$8,8 \pm 0,4$	$7,6 \pm 0,7$	$7,9 \pm 0,4$
HCT (%)	46 ± 0	43 ± 0	42 ± 0

5.1.4 Leberschaden

Durch eine Leberschädigung kommt es zur Störung der hepatozellulären Integrität und damit zur Freisetzung von intrazellulären Enzymen in den Blutkreislauf. Diese Enzyme geben in Abhängigkeit von ihrer intrazellulären Lokalisation und Plasmaspiegel Aufschluss über die Schwere des Leberschadens. Wie auch im klinischen Alltag wurden die Plasmaaktivitäten der Transaminasen (AST, ALT) sowie der GLDH bestimmt, um das Ausmaß der Leberschädigung zu verifizieren (Abb. 10). Die einmalige CCl₄-Gabe führte in allen Gruppen zu deutlich erhöhten Plasmaaktivitäten der Leberenzyme, was auf eine schwere Leberschädigung hinweist. Hierbei hatte jedoch das Foxf1-silencing keinen signifikanten Einfluss auf das Ausmaß des Leberschadens. Insgesamt zeigten sich die Werte der Gruppen mit hohen Varianzen.

In der Puffer-Kontrollgruppe zeigte sich im Mittel ein fast 25-facher Anstieg der AST-Aktivität zur physiologischen Norm, während die Werte der Therapie- (siFoxf1) als auch Kontrollgruppe (siLuci) im Vergleich zu Puffer nur halb so stark anstiegen (Abb. 10 A). Während die beiden Kontrollgruppen (siLuci und Puffer)

im Schnitt 50 bis 65-fach erhöhte ALT-Plasmaaktivitäten im Vergleich zu gesunden Tieren (30-60 U/l) aufwiesen, zeigte die Therapie mit Foxf1-siRNA eine Reduktion auf ca. 400 U/l, konnte aber dennoch nicht als signifikant gewertet werden (Abb. 10 B). Die GLDH, als Parameter für eine besonders schwere Leberschädigung, zeigte in allen Gruppen pathologisch erhöhte Werte. Hierbei wiesen siFoxf1 und siLuci eine 50%-ige Reduktion der Werte gegenüber der Kontrollgruppe (Puffer) auf, wobei sich überraschenderweise die Kontrollgruppe (siLuci) im Vergleich zur Puffer-behandelten Gruppe als signifikant darstellte (Abb. 10 C).

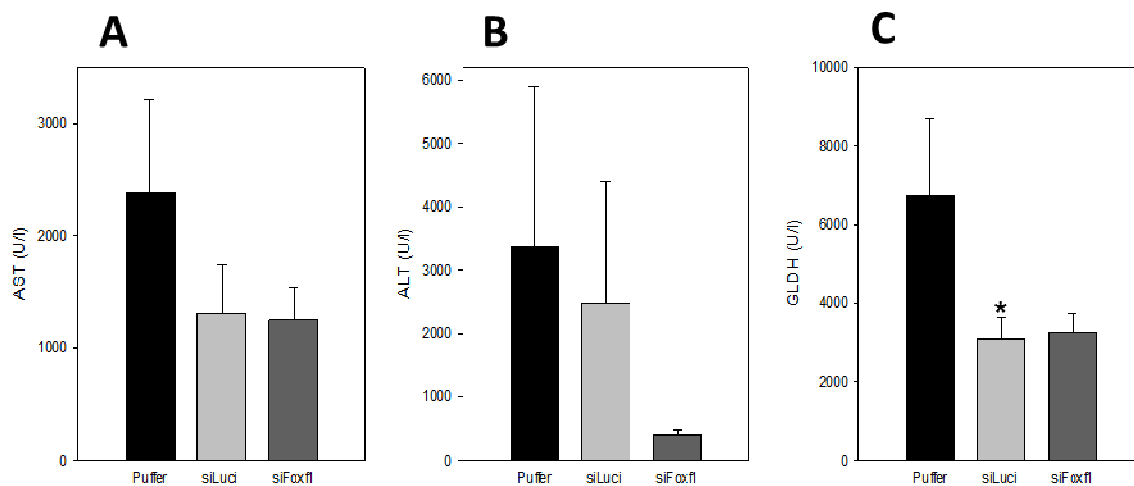


Abbildung 10: Plasmaaktivitäten von AST (A), ALT (B) und GLDH (D) der Kontrollgruppen Puffer und siLuci sowie der Therapiegruppe siFoxf 72 h nach Induktion eines akuten Leberschadens. Alle Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben; One way ANOVA; *p < 0,05 vs. Puffer.

Um das Ausmaß der Leberschädigung auch histologisch zu bewerten, wurden in den Versuchsgruppen des akuten CCl₄-Modells, wie in Abschnitt 4.4.3 beschrieben, H.E. Übersichtsfärbungen angefertigt und nekrotische Areale histomorphometrisch quantifiziert (Abb. 11). Dabei zeigte sich in allen Versuchsgruppen ein nahezu gleiches Ausmaß von zentrilobulären Nekrosen, welches zwischen 27% (siFoxf1) und 30% (Puffer) bis ca. 32% (siLuci) lag.

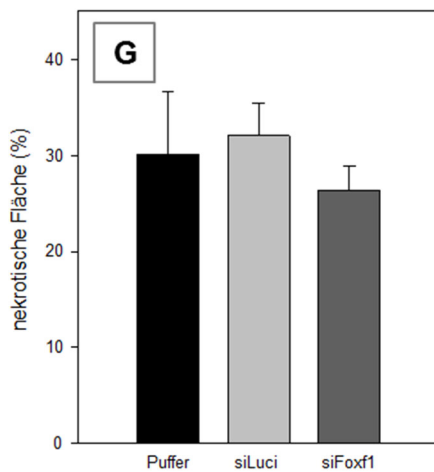
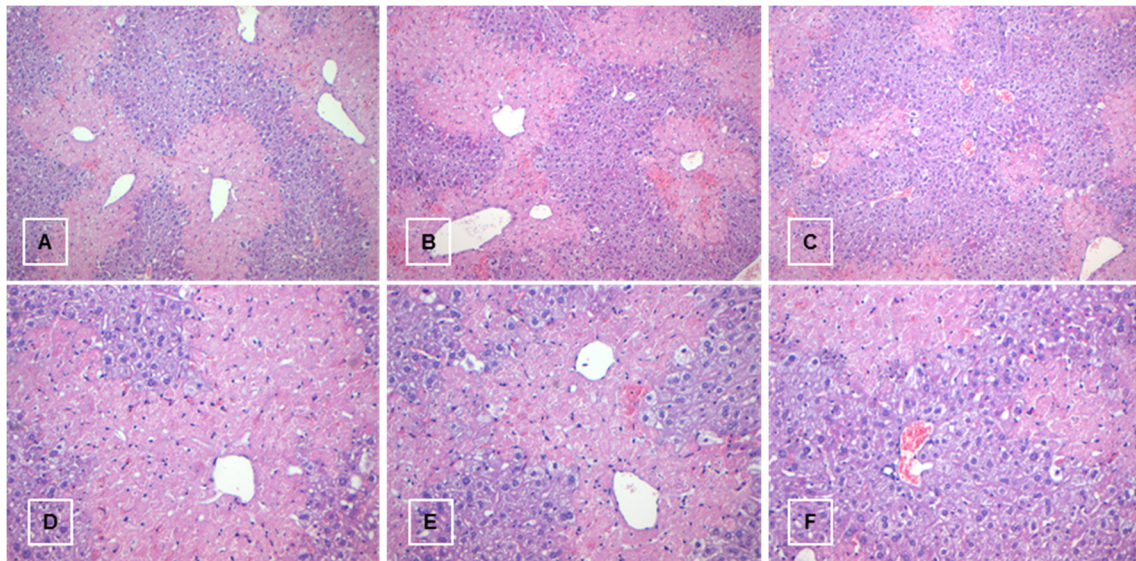


Abbildung 11: Repräsentative Bilder von H.E.-gefärbten Leberschnitten der Kontrollgruppe (Puffer) in 10x (A) und 20x (D) Vergrößerung, der Kontrollgruppe (siLuci) in 10x (B) und 20x (E) Vergrößerung sowie der Therapiegruppe (siFoxf1) in 10 x (C) und 20 x (F) je 72 h nach Induktion eines akuten Leberschadens. Die quantitative Auswertung der nekrotischen Fläche ist in G dargestellt. Alle Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben.

5.1.5 Aktivierung hepatischer Sternzellen

Wie in der Einleitung beschrieben, spielt die Aktivierung der HSC in der Pathogenese der Leberfibrose eine entscheidende Rolle. Da Foxf1 in der Leber ausschließlich von HSC exprimiert wird, untersuchten wir in einem nächsten Schritt anhand des Aktivierungsmarkers α -SMA den Effekt des Foxf1-Silencing auf die Aktivierung der HSC (Abb. 12). Durch die Anzahl α -SMA-positiver Zellen kann somit auch indirekt auf das Ausmaß der Fibrosierung geschlossen werden. Die quantitative Analyse α -SMA-positiver Zellen ergab jedoch keine wesentlichen

Unterschiede zwischen den Kontrollgruppen (Puffer und siLuci) und der Therapiegruppe (siFoxf1). Vielmehr ließen sich in der siFoxf1-Gruppe mehr aktivierte HSC detektieren.

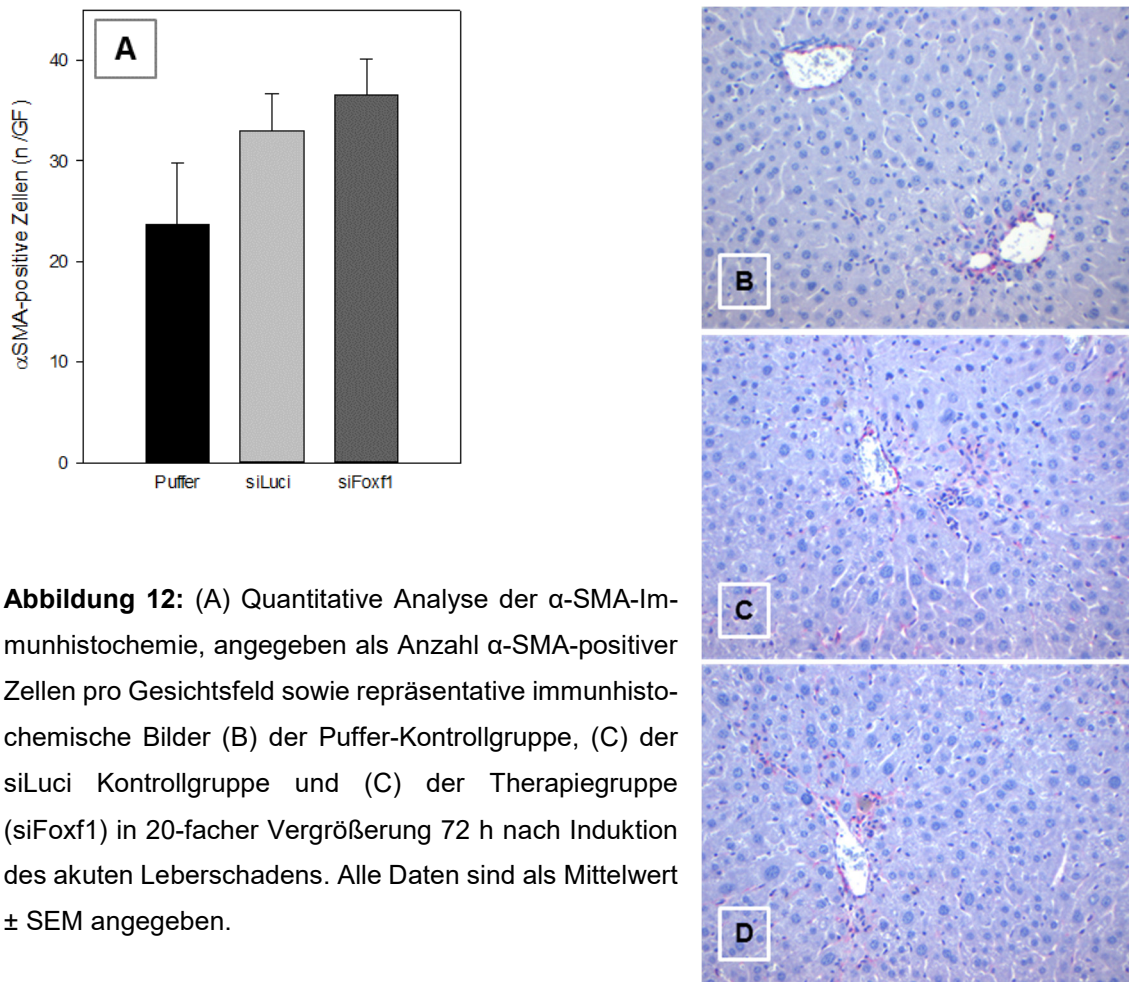


Abbildung 12: (A) Quantitative Analyse der α -SMA-Immunhistochemie, angegeben als Anzahl α -SMA-positiver Zellen pro Gesichtsfeld sowie repräsentative immunhistochemische Bilder (B) der Puffer-Kontrollgruppe, (C) der siLuci Kontrollgruppe und (D) der Therapiegruppe (siFoxf1) in 20-facher Vergrößerung 72 h nach Induktion des akuten Leberschadens. Alle Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben.

5.2 Chronisches Modell

5.2.1 Zustand der Tiere

Um den körperlichen Zustand der Tiere zu beurteilen, führten wir wie auch im akuten Modell Gewichtskontrollen der Mäuse sowie tägliche Visiten durch. Die Gewichtsbestimmung erfolgte im Rahmen der i.p. CCl₄-Injektion zweimal wöchentlich. In den letzten beiden Versuchswochen wurden zusätzliche Gewichtskontrollen im Rahmen der siRNA-Injektionen alle 72 h durchgeführt. Hierbei zeigten alle Versuchsgruppen überraschenderweise geringe Gewichtszunahmen.

Am Tag der Gewebeasservierung (42 d) betrug das Gewicht der Kontrollgruppe Puffer $105,9 \pm 2,9\%$, der siLuci Gruppe $103,9 \pm 1,8\%$ und der Therapiegruppe siFoxf1 $101,7 \pm 1,3\%$ des Ausgangsgewichts. Wie auch im akuten Modell zeigten die Tiere im Anschluss an die erste CCl₄-Injektion eine deutliche Reduktion der körperlichen Aktivität. Im weiteren Verlauf nahm die körperliche Aktivität trotz der zweimal wöchentlich durchgeführten CCl₄-Applikation in allen Gruppen wieder zu, sodass zum Ende des chronischen Versuchsmodells nur geringe Aktivitätsunterschiede im Vergleich zu unbehandelten Mäusen sichtbar waren. In den ersten vier Wochen verstarben insgesamt vier Mäuse infolge der mehrfachen CCl₄-Applikation. Außerdem mussten zwei weitere Mäuse aus dem Versuch ausgeschlossen werden, da sie die Narkose zur i.v.-Applikation der siRNA-Lipoplexe nicht überlebten.

5.2.2 Foxf1-Silencing

Um einen möglichen Knockdown unseres Zielgens Foxf1 nachzuweisen, führten wir eine RT-PCR durch (Abb. 13). Während im akuten Versuchsmodell eine signifikante Reduktion der relativen mRNA-Expression unseres Zielgens nachzuweisen war, ließen sich diese Ergebnisse im chronischen Versuchsmodell nicht bestätigen. In der Kontrollgruppe (Puffer) sowie der Therapiegruppe (siFoxf1) wiesen wir eine ähnliche Foxf1 mRNA-Expression von ca. 1 nach. Die siLuci Tiere zeigten relative mRNA-Expressionswerte von ca. 1,3, was jedoch nicht signifikant war (Abb. 13).

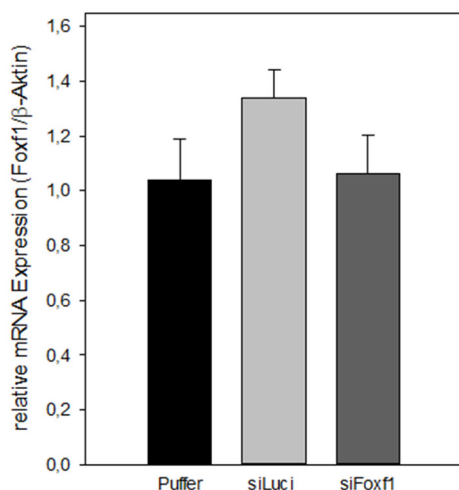


Abbildung 13: Relative Expression der Foxf1-mRNA im Lebergewebe der Kontrollgruppen (Puffer und siLuci) sowie der Therapiegruppe (siFoxf1) 42 Tage nach Versuchsbeginn. Alle Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben.

5.2.3 Vollblutanalyse

Wie bereits beschrieben, führen Lebererkrankungen häufig zu Störungen der Hämatopoese und gehen mit Blutbildveränderungen einher. Eine chronische Schädigung der Leber führt dabei zu einer chronischen Entzündungsreaktion im Lebergewebe. Diese kann sich im Blutbild durch eine Entzündungsanämie oder durch Veränderungen der weißen Blutzellreihe darstellen. Die portale Hypertension als Folge des degenerativen Leberumbaus führt häufig zur Ausbildung einer Splenomegalie. Der dadurch bedingte vermehrte Zellabbau ist eine Ursache von möglichen Thrombozytopenien. Daher wurden Parameter der roten Blutzellreihe wie Erythrozytenzahl, Hämatokrit- und Hämoglobinwert sowie die absolute Leukozyten- und Thrombozytenzahl bestimmt (Tab. 4). Die Analyse aller Parameter erbrachte nahezu in allen Gruppen physiologische Werte. Lediglich bei Betrachtung der Thrombozyten fiel auf, dass die Behandlung mit Foxf1-siRNA die Thrombozytenzahl signifikant auf deutliche thrombozytopenische Werte reduzierte, während die Werte der Kontrollgruppen im Normalbereich (Puffer) bzw. geringfügig unterhalb lagen (siLuci).

Tabelle 4: Leukozytenzahl (WBC), Thrombozytenzahl (PLT), Erythrozytenzahl (RBC), Hämoglobinwert (HGB) und Hämatokrit (HKT) der Kontrollgruppen (Puffer u. siLuci) sowie der Therapiegruppe (siFoxf1) 42 Tage nach Induktion eines chronischen Leberschadens. Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben; * $p < 0,05$ vs. Puffer.

	Puffer	siLuci	siFoxf1
WBC ($\times 10^9/l$)	6,3 \pm 0,6	8,4 \pm 2,9	5,3 \pm 0,5
PLT ($\times 10^9/l$)	1302,4 \pm 72,1	979,6 \pm 157,6	658 \pm 136,7 *
RBC ($\times 10^{12}/l$)	8,4 \pm 0,1	7,3 \pm 0,7	7,8 \pm 0,3
HGB (mmol/l)	7,5 \pm 0,3	6,8 \pm 0,7	7,2 \pm 0,3
HKT (%)	42 \pm 0	36 \pm 1	38 \pm 1

5.2.4 Leberschaden

Um die Ausprägung der CCl₄-induzierten Leberschädigung zu untersuchen, führten wir analog zum akuten Modell die Plasmaaktivitätsbestimmung der Transaminasen AST und ALT sowie des vorwiegend mitochondrialen Enzyms GLDH durch. Während im akuten Modell die Plasmawerte jeweils um ein Vielfaches (bis zu 60-fach) der Norm erhöht waren, zeigten sich im chronischen CCl₄-Modell die Leberenzyme eher moderat erhöht und lagen lediglich leicht oberhalb des physiologischen Referenzbereichs (Abb. 14). Bei den Transaminasen (Abb. 14 A, B) konnten keine Unterschiede zwischen den Gruppen beobachtet werden. Die Bestimmung der GLDH (Abb. 14 C) ergab für die Puffer-Gruppe eine Plasmaaktivität von ca. 150 U/l, während die siLuci-Gruppe Werte von ca. 300 U/l aufwies. Die Therapiegruppe siFoxf1 zeigte eine im Vergleich zur Puffer-Gruppe signifikante Reduktion der GLDH um ca. 50%.

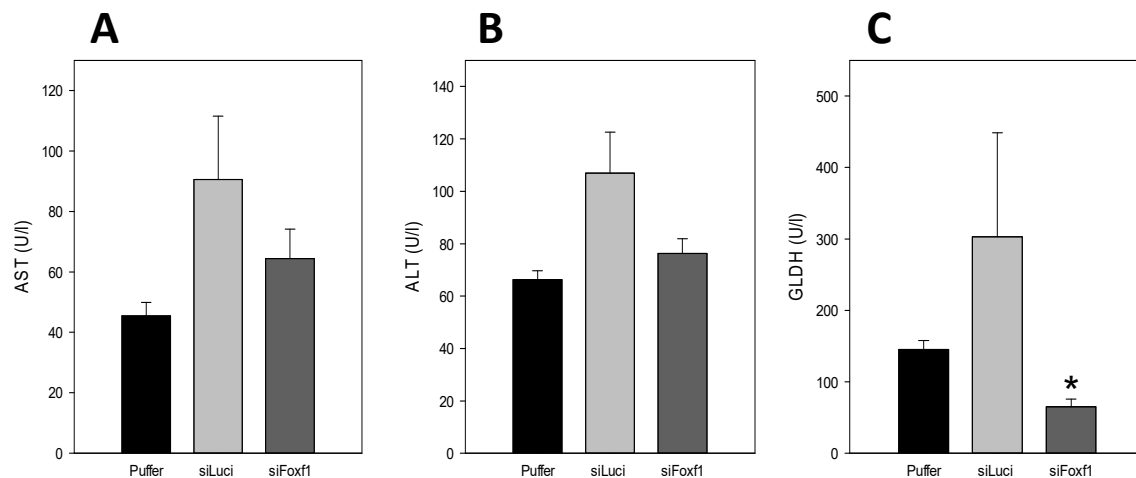


Abbildung 14: Plasmaaktivitäten von AST (A), ALT (B) und GLDH (C) der Puffer-, siLuci- und siFoxf1-behandelten Tiere 42 Tage nach Induktion eines chronischen Leberschadens. Alle Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben; One way ANOVA on Ranks; *p < 0,05 vs. Puffer.

5.2.5 Leberfibrose

Die Produktion und Ablagerung von EZM beschreibt im Rahmen der Leberfibrosierung einen finalen pathogenetischen Schritt. Kollagen-1 α spielt dabei als Hauptbestandteil der EZM eine wesentliche Rolle und dient als etablierter Fibromarker. Die Analyse der Kollagen-1 α mRNA-Expression ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Untersuchungsgruppen (Abb. 15). Überraschenderweise zeigten die DBTC-siRNA-behandelten Gruppen tendentiell höhere Werte als die Puffer-behandelten Tiere.

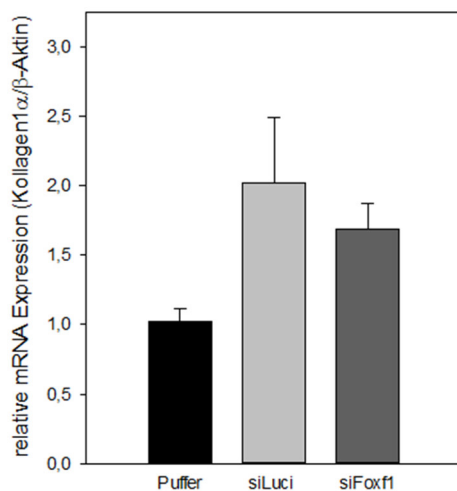


Abbildung 15: Relative mRNA Expression von Kollagen-1 α im Lebergewebe der Kontrollgruppen (Puffer und siLuci) sowie der Therapiegruppe (siFoxf1) 42 Tage nach Versuchsbeginn. Alle Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben.

Zusätzlich zu den molekularbiologischen Untersuchungen führten wir immunhistochemische Analysen des Fibrosierungsmarkers Kollagen-1 α durch (Abb. 16). In allen Gruppen konnte sehr eindrücklich eine brückenbildende Fibrosierung, ausgehend von Zentralfeldern, beobachtet werden (Abb. 16). Die quantitative Auswertung der Kollagen-1 α -positiven Flächen zeigte auch hier keine signifikanten Unterschiede zwischen der Therapie- und den Kontrollgruppen (Abb. 16 G). Diese Ergebnisse bestätigen die molekularbiologischen Ergebnisse der mRNA-Expression.

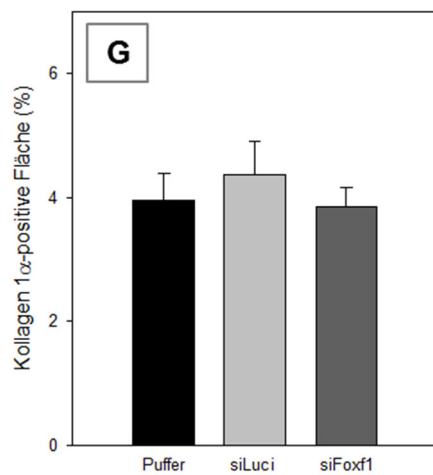
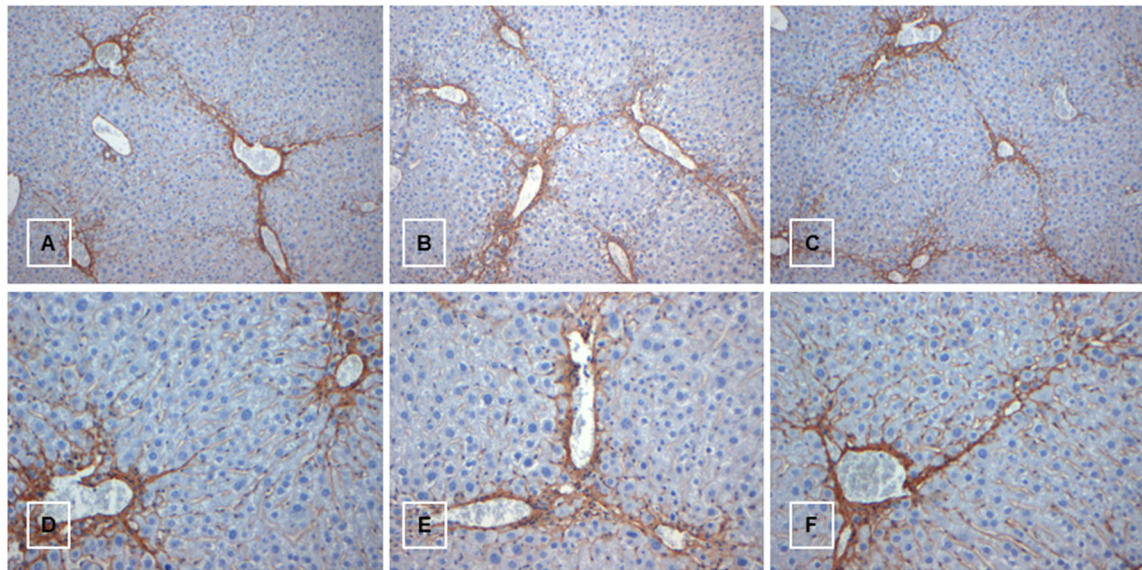


Abbildung 16: Repräsentative immunohistochemische Bilder von Kollagen-1α der Kontrollgruppe (Puffer) in 10x (A) und 20x (D) Vergrößerung, der Kontrollgruppe (siLuci) in 10x (B) und 20x (E) Vergrößerung sowie der Therapiegruppe (siFoxf1) in 10 x (C) und 20 x (F) 42 Tage nach Versuchsbeginn. Die histomorphometrische Auswertung der Kollagen-1α-positiven Flächen in Prozent ist in G dargestellt. Alle Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben.

Um zu untersuchen, ob die Behandlung einen Einfluss auf die Aktivierung von HSC hat, führten wir analog zum akuten Versuchsmodell die quantitative Bestimmung α -SMA-positiver Zellen im Leberschnitt durch. Ähnlich wie im akuten Modell konnten wir auch hier keine Unterschiede in der Anzahl α -SMA-positiver Zellen zwischen den jeweiligen Gruppen feststellen (Abb. 17).

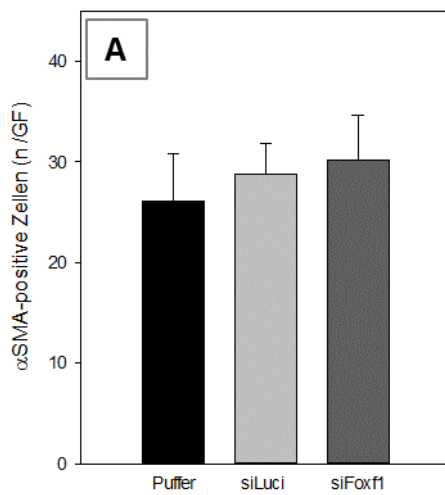
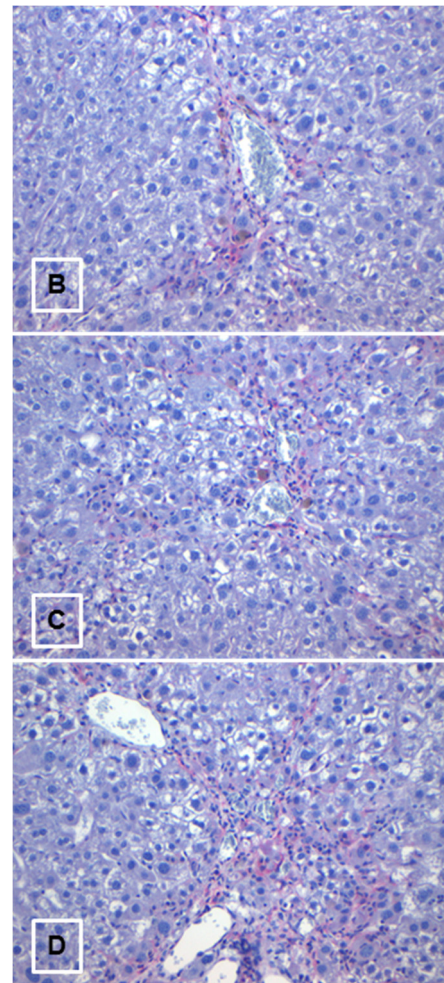


Abbildung 17: (A) Quantitative Analyse α -SMA-positiver Zellen (Anzahl pro Gesichtsfeld) sowie repräsentative immunhistochemische Bilder von α -SMA in der Puffer- (B), siLuci- (C) und siFoxf1-Gruppe (D) in 20-facher Vergrößerung 42 Tage nach Versuchsbeginn. Alle Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben.



6 Diskussion

6.1 Material und Methoden

Die Leberfibrose ist das Ergebnis einer Wundheilungsreaktion, welche die Antwort auf wiederholte Leberschädigungen darstellt. Der parenchymatöse Umbau mit der Ausbildung von Regeneratknoten und fibrotischen Septen charakterisiert dabei den Übergang zur Leberzirrhose und stellt damit den Endpunkt der meisten chronischen Lebererkrankungen dar (Friedman, 2003). Die vielfältigen zugrunde liegenden Ursachen der Erkrankung wurden bereits in Kapitel 3.1.2 behandelt. Durch die weltweit ansteigende Inzidenz und Mortalität, mit jährlich über 1 Million Todesfällen, hat sich die Leberzirrhose zu den Hauptursachen des weltweiten Krankheitsleidens entwickelt (Mokdad *et al.*, 2014). Die vielfältigen Risiken und Komplikationen, welche mit der Leberzirrhose einhergehen, führen zu häufigen Re-Hospitalisierungen dieses Patientenkollektivs. Dies beeinträchtigt Patienten und deren Angehörige nachhaltig und führt nachweislich zu einem verschlechterten Outcome. Die daraus entstehenden Kosten stellen eine zusätzliche Belastung für das Gesundheitssystem dar (Chirapongsathorn *et al.*, 2016) und verdeutlichen damit das sozioökonomische Problem dieser Erkrankung. Bislang existieren, abgesehen von der Lebertransplantation, keine kurativen Therapiestrategien zur Behandlung der Leberzirrhose. Allein 2015 wurden deutschlandweit fast 1500 Patienten der Transplantationswarteliste hinzugefügt, wovon Patienten mit Leberfibrose bzw. Leberzirrhose den führenden Anteil ausmachten. Die Anzahl an durchgeführten Transplantationen lag mit knapp 900 jedoch deutlich darunter (Tacke *et al.*, 2016). Dies verdeutlicht das von Jahr zu Jahr zunehmende Missverhältnis zwischen potenziellen Organspendern und benötigten Organen und macht alternative Therapieoptionen erforderlich.

Die in den letzten Jahren immer weiter zugenommene Kenntnis über die pathophysiologischen Abläufe der Fibrogenese bietet die Grundlage für die Etablierung neuer Therapieansätze. Zur Erlangung dieser Kenntnisse und zur Etablierung möglicher Therapiestrategien stehen verschiedene Modelle zur Verfügung. Eine Möglichkeit besteht in der Isolierung von gesunden oder experimentell geschädigten Leberzelltypen, um diese *in vitro* zu untersuchen (Iredale, 2007). Die Kultivierung von Hepatozyten (Jia *et al.*, 1998), HSC (Li & Jiang, 2014) und anderen

Zelltypen (Hao *et al.*, 2013) ermöglicht dabei eine detaillierte Aufschlüsselung von Regulationsmechanismen, Zellverhalten und Auswirkungen von spezifischen Mediatoren. Ein großer Nachteil besteht nun darin, dass das komplexe Zusammenspiel der unterschiedlichsten Zell- und Gewebetypen *in vivo* nicht *in vitro* simuliert werden kann. Neben der Zellkultur dienen humane Gewebeproben als weiteres Modell, um pathophysiologische Grundlagen zu evaluieren. Durch Leberbiopsien (Allam *et al.*, 2015) oder Organentnahmen (Tao *et al.*, 2015) stehen humane Gewebeproben zur Verfügung, welche im Anschluss den unterschiedlichsten Analysen unterzogen werden können. Dieses Vorgehen ermöglicht Beobachtungen aus Tiermodellen oder Gewebekulturen im menschlichen Gewebe zu bestätigen (Iredale, 2007). Hierbei werden jedoch lediglich Momentaufnahmen beschrieben, da konsekutive Gewebebiopsien aufgrund ethischer Richtlinien nicht möglich sind. Hinzu kommen Kontraindikationen sowie häufig auftretende Komplikationen der Gewebeentnahme. Die beschriebenen Nachteile und Problemstellungen der zuvor genannten Modelle können durch das experimentelle Tiermodell umgangen werden. Das Tiermodell ist somit zur Erforschung der Leberfibrose und anderer fibrotischer Erkrankungen wichtig, da es als einziges die fortlaufende Gewebeentnahme und damit die Untersuchung des dynamischen Prozesses ermöglicht und zusätzlich die komplexen Interaktionen der unterschiedlichen Zellsysteme *in vivo* berücksichtigt (Constandinou *et al.*, 2005; Iredale, 2007). Dennoch muss kritisch angemerkt werden, dass kein Tiermodell die perfekte Simulation der humanen Pathogenese bieten kann (Starkel & Leclercq, 2011).

Trotz etwaiger pathogenetischer Unterschiede zum Menschen sind Nagetiermodelle die derzeit beste Möglichkeit zur Erforschung der Leberzirrhose. Diese Modelle bieten die Möglichkeit nahezu jede Lebererkrankung unabhängig ihrer Ätiologie zu simulieren und stellen somit den Goldstandard der experimentellen Forschung dar (Liedtke *et al.*, 2013). Zunächst wurden Fibrosierungsmodelle hauptsächlich für Ratten entwickelt, letztlich aber immer häufiger ins Mausmodell übertragen (Starkel & Leclercq, 2011), da das Genom der Maus in über 95 % mit dem humanen übereinstimmt (Walkin *et al.*, 2013) und sich somit genetische Vorteile bieten.

Die zur Induktion der Leberzirrhose etabliertesten experimentellen Modelle sind die operative Anlage einer Gallengangsligatur (BDL= Bile duct ligation) sowie die wiederholte Applikation toxischer Substanzen (Constandinou *et al.*, 2005; Tsukamoto *et al.*, 1990). Die BDL, die zunächst in Ratten zur Anwendung kam, ist das am häufigsten angewendete Modell, um einen cholestatischen Leberschaden zu induzieren (Kountouras *et al.*, 1984). Nach medianer Laparotomie wird der Gallengang freipräpariert, dreifach ligiert und letztlich durchtrennt. Der resultierende Aufstau der Gallensäuren führt zu einer dukталen Reaktion mit Proliferation des Gallengangsepithels, was letztlich zur portalen Inflammation und Ausbildung einer portalen Fibrose führt (Georgiev *et al.*, 2008; Abshagen *et al.*, 2015c; Abshagen *et al.*, 2015b; Abshagen *et al.*, 2015a). Trotz ihres guten Rufes als schnelles und reproduzierbares Verfahren (Liedtke *et al.*, 2013) gilt es einige Punkte zu bedenken. Durch die cholestatisch bedingte Dilatation der Gallenblase besteht die Gefahr der Perforation mit Ausbildung einer letal endenden Peritonitis (Abralles *et al.*, 2006). Zusätzlich bestehen Zweifel an der beschriebenen Reproduzierbarkeit im Mausmodell. Durch die interindividuell unterschiedliche Dilatation der Gallenblase kommt es folglich zu einem unterschiedlich starken Gallerückstau ins Leberparenchym und somit zur unterschiedlich starken Gewebereaktion bzw. Ausbildung der Fibrosierung (Starkel & Leclercq, 2011). Um dies zu umgehen, sollte die Gallenblase entfernt werden (Mederacke, 2013). Ein wesentlicher Vorteil des Modells besteht in der direkten Übertragbarkeit des Pathomechanismus von der Maus auf den Menschen. Trotzdem sind cholestatische Lebererkrankungen nur in 5-15 % der Fälle für die Ausbildung chronischer Lebererkrankungen verantwortlich (Kuntz & Kuntz, 2008) und machen daher die Anwendung anderer experimenteller Schädigungsmodelle erforderlich.

In Nordamerika und Europa sind chronische Lebererkrankungen hauptsächlich auf den übermäßigen Konsum von Alkohol zurückzuführen (Mathurin & Bataller, 2015), der in der Leber durch das Enzym Alkoholdehydrogenase sowie das Mikrosomale Ethanol-Oxidierende System (MEOS) zu Acetaldehyd verstoffwechselt wird. Das bei übermäßigem Alkoholkonsum verstärkt anfallende Acetaldehyd führt unweigerlich zur Hepatozytenschädigung und ist damit direkt lebertoxisch (Herold, 2011). Da etliche Nagetiere eine Aversion gegen Alkohol aufweisen und teilweise resistent gegen eine Alkohol-induzierte Fibrose sind (Starkel &

Leclercq, 2011), steht mit der Applikation von CCl_4 ein alternatives, gut etabliertes Modell zur toxischen Hepatozytenschädigung zur Verfügung. Neben CCl_4 existieren weitere toxische Agenzien wie Thioacetamide (TAA) und Dimethyl/Diethylnitrosamine (DMN/DEN) zur Induktion der Leberfibrose. Da CCl_4 eine deutlich schnellere Leberschädigung hervorruft und zusätzlich einen direkten zytotoxischen Effekt aufweist, wird es deutlich häufiger als TAA und DEN zur experimentellen Leberschädigung genutzt (Tan *et al.*, 2016).

Um eine Schädigung zu provozieren, stehen unterschiedliche CCl_4 -Applikationsformen zur Verfügung. Die orale Applikation als nichtinvasive Form ist hierbei jedoch schlecht zu dosieren und oftmals mit einer erhöhten frühzeitigen Mortalität assoziiert (McLean *et al.*, 1969). Eine weitere Applikationsform stellt die Inhalation von CCl_4 dar, welche eine bessere Analyse von Aszitesbildung und portaler Hypertension aufgrund der nicht vorhandenen peritonealen Reaktion ermöglicht (Domenicali *et al.*, 2009). Sie ist jedoch durch den komplexen Versuchsaufbau und die starke Untersucherabhängigkeit (Domenicali *et al.*, 2009) schwierig zu etablieren und daher speziellen Fragestellungen vorbehalten. Die intraperitoneale (i.p.) Applikation stellt im Gegensatz zur Inhalation einen leicht zu erlernenden, gut zu dosierenden und daher gut zu reproduzierenden Weg dar, um eine Leberfibrose zu induzieren. Nach der Applikation wird CCl_4 durch das Isoenzym CYP2E1 in ein toxisches Trichlormethyl-Radikal ($\text{CCl}_3\cdot$) umgewandelt (Raucy *et al.*, 1993) und damit metabolisch aktiviert. Durch das gehäufte Vorkommen von Isoenzym CYP2E1 in perizentral gelegenen Hepatozyten (Diaz Gómez, Maria *et al.*, 2006) kommt es hier zur intensivierten Metabolisierung. Die Folge sind charakteristische zentrilobuläre Nekrosen, die mit hohen Transaminasenspiegeln einhergehen und somit die hohe Anzahl an Nekrose-bedingtem Zelltod widerspiegeln (Iredale, 2007; Weber *et al.*, 2003; Mederacke, 2013). Extrahepatische Schäden sind hierbei minimal, da CYP2E1 außerhalb der Leber kaum exprimiert wird (Starkel & Leclercq, 2011). Histologisch signifikante Fibrosen sind bei wiederholter CCl_4 -Applikation bereits nach 2-4 Wochen nachzuweisen (Starkel & Leclercq, 2011). Auch bei einmaliger Applikation sind aufgrund der massiven Hepatotoxizität von CCl_4 deutliche histologische und laborchemische Leberschäden zu verifizieren, was die Etablierung eines akuten Versuchsmodells ermöglicht.

Während im chronischen Modell die Fibrosen histologisch nachweisbar sind, besteht bei singulärer Schädigung die Möglichkeit, Fibrosierungstendenzen anhand der mRNA-Expression nachzuweisen (Mederacke, 2013). Trotz des relativ kurzen Fibrosierungszeitraums bei wiederholter CCl₄-Applikation scheint die BDL in diesem Punkt zeitliche Vorteile zu bieten und eine schnellere Fibrosierung zu ermöglichen (Chang *et al.*, 2005). Durch die zusätzliche Applikation eines CYP2E1-Induktors kann die CCl₄-Toxizität jedoch verstärkt werden, um eine schnellere Fibrosierung zu erzielen (Constandinou *et al.*, 2005). Umgekehrt führt die Applikation eines CYP2E1-Inhibitors zur verminderten Ausbildung der Fibrose. Dies gilt es bei der Auswahl eines Therapeutikums im experimentellen CCl₄-Modell zu bedenken. Ein möglicher therapeutischer Effekt wäre hierbei nicht auf das Medikament, sondern vielmehr auf den verminderten toxischen Effekt von CCl₄ zurückzuführen (Marek *et al.*, 2005). Unter Beachtung der genannten therapeutischen Einschränkung stellt die i.p. CCl₄-Injektion ein ökonomisches (Wu & Norton, 1996), gut reproduzierbares und gleichzeitig das am häufigsten genutzte toxische Leberschädigungsmodell der Maus dar (Mederacke, 2013).

Besonders häufig werden hierbei Mäuse des Stammes BALB/c (WU *et al.*, 2016; You *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2015a) verwendet. Während diese Mäuse gegen die Entwicklung einer Lungenfibrose resistent sind (Schrier *et al.*, 1983), entwickeln sie modellübergreifend die ausgeprägtesten Leberfibrosen (Hillebrandt *et al.*, 2002). Ein besonders starker Fibrosierungseffekt kann dabei durch die Applikation von CCl₄ hervorgerufen werden (Walkin *et al.*, 2013). Dies wird durch die Tatsache gestützt, dass im Gegensatz zu Mäusen des Stammes C57BL/6 oder FVB/N, BALB/c Mäuse deutlich ausgeprägtere Fibrosen durch CCl₄-Applikation entwickeln (Hillebrandt *et al.*, 2002).

Während die Fibrosierung im experimentellen Mausmodell in nur wenigen Wochen nachzuweisen ist, sind fibrotische Parenchymveränderungen im Menschen, abhängig von der Schädigung, erst nach Monaten bis Jahren nachweisbar. Oftmals wird die Diagnose der Leberfibrose bzw. -zirrhose aufgrund der wesentlich später einsetzenden klinischen Symptomatik erst in einem Stadium der fortgeschrittenen Organfibrosierung gestellt. Daher sind antifibrotische Therapeutika, welche den Prozess der Fibrosierung hemmen oder im besten Fall sogar rück-

gängig machen, von besonderem Interesse. Die meisten experimentellen Ansätze adressieren dabei die HSC und TGF- β als Target der antifibrotischen Therapie (Gressner & Weiskirchen, 2006). Während TGF- β aufgrund seines ubiquitären Vorkommens in den verschiedensten Regulationsmechanismen ein eher unspezifisches Target darstellt, ist die HSC nicht nur aufgrund ihrer Funktion als Hauptproduzent der EZM (Gabele *et al.*, 2003) und ihrer Schlüsselfunktion im Rahmen der Leberfibrosierung (Friedman, 2008) das wahrscheinlich vielversprechendste Ziel in der Entwicklung neuer Therapieansätze. Die immer weiter zunehmende Kenntnis über Regulationsmechanismen und molekulare Abläufe der HSC hat bislang etliche Therapieansätze hervorgebracht, die bereits im experimentellen Ansatz verheißungsvolle Ergebnisse lieferten, aber bislang aufgrund unerwünschten Nebeneffekte sowie mangelnder *in vivo*-Effektivität (Schon *et al.*, 2016) nicht ins klinische Setting überführbar waren.

Seit einiger Zeit erfreut sich die gentherapeutische Modulation HSC-spezifischer Gene wachsender Beliebtheit. Die Grundlage bietet das Wissen über die Genexpression während der HSC-Aktivierung, das in den letzten Jahren durch intensive Grundlagenforschung enorm erweitert werden konnte. Ein deutlicher Wissenszuwachs wurde bereits um die Jahrtausendwende durch die Arbeitsgruppe um Kristensen *et al.* (2000) durch deren gezielte Analyse Aktivierungs-assoziiierter Proteinveränderungen in HSC, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, erzielt. Zusätzlich bietet die Untersuchung transgener Tiermodelle die Möglichkeit, Erkenntnisse über die potenziell an der Entstehung der Leberfibrose beteiligte Gene zu erlangen. So zeigte kürzlich z.B. die Arbeitsgruppe um Tang *et al.* (2016) eine gehäufte HSC-Aktivierung und damit einhergehende verstärkte Leberfibrose in Mäusen mit einem Knockout des Xenobiotikum-Transporters OCTN1/SLC22A4 als Antwort auf den toxischen DMN-Stimulus. Die Haploinsuffizienz des mesenchymalen Transkriptionsfaktors GATA-4 verursachte in adulten Mäusen eine deutlich beschleunigte Leberfibrosierung nach wiederholter CCl₄-Applikation (Delgado *et al.*, 2014). Im Gegensatz dazu zeigten Hic-5-defiziente Mäuse eine verminderte HSC-Aktivierung, einhergehend mit einer verminderten Leberfibrose als Antwort auf eine CCl₄- sowie BDL-induzierte Leberschädigung (Lei *et al.*, 2016). Ähnliche Ergebnisse wurden bereits 2003 durch die Arbeitsgruppe um Kalinichenko erzielt. Foxf1-heterozygote Mäuse zeigten dabei eine verminderte

HSC-Aktivierung und Leberschädigung als Reaktion auf eine repetetive CCl₄-Schädigung. Diese Beobachtung diente als Grundlage für die hier vorliegende Studie (Kalinichenko *et al.*, 2003).

Die Hemmung bzw. Überexpression pro- bzw. antifibrotischer Gene stellt noch immer das Hauptziel der leberfibrotischen Grundlagenforschung dar (Liedtke *et al.*, 2013) und bildet somit das Fundament der antifibrotischen Gentherapie. Ein vielversprechender gentherapeutischer Ansatz bildet das bereits in der Einleitung beschriebene, körpereigene, epigenetische Regulationssystem der RNA-Interferenz. Um therapeutisch relevante Nukleinsäuren an deren Bestimmungsort, nämlich der Zielzelle, zu transportieren, stehen virale und nicht virale Vektoren als Transportsystem zur Verfügung.

Dabei stellen virale Vektoren die bislang am häufigsten genutzte Methode dar, um Gene in lebende Organismen zu transferieren. Die Erfolgsrate von nahezu 100 % infizierter Zellen, ohne wesentliche Beeinflussung des Zellüberlebens, verdeutlicht den Stellenwert dieses Shuttles. Betrachtet man die Gesamtheit viraler Vektoren, so konnte die adenoviral-vermittelte Genzufuhr in fibrotischen Lebermodellen die bislang vielversprechendsten Ergebnisse aufzeigen (Salazar-Montes *et al.*, 2015). Die Arbeitsgruppe um Atta *et al.* stellte jüngst eine Studie zur Milderung der CCl₄-induzierten Leberschädigung durch einen adenoviral-vermittelten Gentransfer von Hepatocyte growth factor (HGF) und Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) in Parenchymzellen und HSC vor (Atta *et al.*, 2014). Ähnliche Ergebnisse zeigte der Gentransfer von Matrix Metalloproteinase-8 (MMP-8) durch einen chimären Adenovirus-HepB-Virus-Vektor, welcher die toxische TAA-Leberschädigung lindern konnte (Liu *et al.*, 2013). Trotz des natürlichen Hepatotropismus von Ad-Vektoren, der deren Eignung in der Therapie von Lebererkrankungen bestätigt (Volpers & Kochanek, 2004), der hohen Gentransfer-Effizienz der Zellen sowie der dauerhaften Transduktion von therapeutischen Genen bestehen dennoch nicht zu verachtende Risiken. Traurige Berühmtheit erlangte in diesem Zusammenhang der Fall von Jesse Gelsinger, der sich bereits 1999 als freiwillige Testperson für einen adenoviralen Therapieversuch zur Verfügung stellte und durch die Immunreaktion mit nachfolgendem Multiorganversagen zu Tode kam (Wilson, 2009). Auch wenn dieser tragische Fall mittlerweile fast 20 Jahre zurückliegt, bleibt die Grundproblematik bis heute bestehen. Virale

Proteine, die eine zusätzliche potenzielle Toxizität aufweisen können, aktivieren das angeborene Immunsystem und können in Abhängigkeit der resultierenden Reaktion letztlich im potenziell letalen Multiorganversagen enden. Dies wird somit auch zukünftig ein Hindernis der adenoviral-vermittelten Gentherapie darstellen (Thaci *et al.*, 2011). Zur Reduktion dieser Risiken können virale Vektoren aufwendig aufgereinigt werden, was neben der ohnehin schon teuren Herstellung zusätzliche Kosten verursacht. Die Nutzung viraler Vektoren, zu denen neben Adenoviren auch adeno-assoziierte Viren, Retroviren und Lentiviren zählen, birgt ein zusätzliches nicht zu vernachlässigendes Risiko. Durch die potenzielle Integration des transduzierten Therapiegens ins Wirtsgenom können Insertionsmutationen entstehen, die mit einem erhöhtem Risiko für die Entwicklung von Malignomen einhergehen (Salazar-Montes *et al.*, 2015). Die potenzielle Kanzerogenität sowie die beschriebene Immunreaktion limitieren dabei die viralen Transportvehikel und machen die Verwendung alternativer Vektoren erforderlich. Durch die zunehmende Optimierung von Lipoplexen und Polyplexen in den letzten Jahren steht damit ein alternatives Vektorsystem zur Verfügung, welches neben physikalischen und mechanischen Methoden wie Particle-Gun, Mikroinjektion, Magnetofektion oder Elektroporation den nicht-viralen Vektoren zuzuordnen ist (Mehier-Humbert & Guy, 2005). Lipoplexe ermöglichen den Transfer von Plasmiden, also zirkulär doppelsträngigen DNA-Molekülen, oder wie in der vorliegenden Studie den Transfer von einzelsträngigen bzw. doppelsträngigen niedermolekularen RNA-Molekülen zur Antisense-Therapie. Diese Lipoplexe basieren hauptsächlich auf polykationischen Strukturen, weil erst durch deren positive Ladung die Möglichkeit zur Interaktion mit den negativ geladenen Nukleinsäuremolekülen besteht (Novo *et al.*, 2015). Trotz der im Vergleich zu viralen Vektoren geringeren Transfektionseffizienz stellen Lipoplexe nicht nur aufgrund ihrer kostengünstigen und einfachen Synthese eine mehr als gleichwertige Alternative dar. Ihre uneingeschränkte Transportkapazität bezüglich der zu transportierenden Gengröße (Singh *et al.*, 2015) sowie deren mangelnde Toxizität und Immunogenität (Fehring *et al.*, 2014) machen sie als Gentransfersystem äußerst interessant. Organische Nanopartikel sollten daher aufgrund ihrer Bioverträglichkeit als klinisch relevantere Nanocarrier in Betracht gezogen werden (Schon *et al.*, 2016).

6.2 Ergebnisse

Im Zuge der Leberfibrosierung beschreibt die Transdifferenzierung von ruhenden HSC zu Myofibroblasten einen wesentlichen pathogenetischen Schritt. Daher stellen aktivierende und inhibierende Transkriptionsfaktoren in HSC ein vielversprechendes Tool für eine antifibrotische Therapie dar (Schon *et al.*, 2016; Abshagen *et al.*, 2015a)). Die Auswahl von Foxf1 als potenzielles Therapiegen basiert auf den Erkenntnissen von Kalinichenko *et al.*, die nach CCl₄-Leberschädigung eine fehlerhafte HSC-Aktivierung in Foxf1^{+/-} Mäusen mit verminderter Expression von Kollagen-1 sowie α -SMA beobachteten (Kalinichenko *et al.*, 2003). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Foxf1 maßgeblich an der transkriptionalen Regulation bzw. Aktivierung der HSC beteiligt ist und somit eine wesentliche Funktion im Rahmen des Leberfibrosierungsprozesses einnimmt. Zudem sind aktivierende Transkriptionsfaktoren für eine Therapie besonders attraktiv, da sie den direktesten Signalweg darstellen, um eine HSC-Aktivierung zu unterdrücken (Friedman, 2008).

Die vorliegende Studie diente als zweiter, unabhängiger experimenteller Ansatz, um Ergebnisse einer vorhergehenden Studie unserer Arbeitsgruppe zu bestätigen, in welcher bereits DBTC Foxf1-siRNA zur antifibrotischen Therapie bei BDL-induzierter Leberfibrose eingesetzt wurde. In dieser ersten Studie konnten wir mit dem leberspezifischen siRNA Delivery System DBTC erfolgreich die Foxf1 Expression in HSC *in vitro* und *in vivo* unterdrücken und somit das Ausmaß der Leberfibrose reduzieren (Abshagen *et al.*, 2015a)

Obwohl bislang etliche therapeutische Ansätze vielversprechende *in vitro* und *in vivo* Ergebnisse zeigten, wurde bislang kein Ansatz in den klinischen Alltag überführt. Dies ist hauptsächlich auf die mangelnde Zellspezifität und die damit verbundenen unerwünschten Nebeneffekte zurückzuführen (Schon *et al.*, 2016). Ein zellspezifisches Targeting ist daher essentiell für eine erfolgreiche Therapie. Die Leberspezifität und vor allem auch ein HSC-spezifisches Delivery der verwendeten DBTC-Formulierung konnte bereits in der oben erwähnten Studie unsere Arbeitsgruppe mittels fluoreszenzmarkierter Lipoplexe nachgewiesen werden (Abshagen *et al.*, 2015a). Des Weiteren zeigten vor einigen Jahren Kalinichenko *et al.* unter Nutzung von kolokalisierenden Experimenten, dass Foxf1 in der Leber

ausschließlich von HSC exprimiert wird (Kalinichenko *et al.*, 2003). Diese Kombination aus leberspezifischem Delivery System und HSC-spezifischem Zielgen bietet daher gute Voraussetzungen für eine effiziente und spezifische Modulation unseres Zielgens, was wiederum unerwünschte Nebeneffekte in anderen Leberzelltypen reduziert (Abshagen *et al.*, 2015a).

Die gezielte Genmodulation mittels verschiedener Vektoren ist eine relativ neue Technologie, welche sowohl die Behandlung erworbener als auch genetischer Erkrankungen ermöglicht (Salazar-Montes *et al.*, 2015). Daher sind gentherapeutische Ansätze zur Behandlung von erworbenen sowie genetischen Ursachen der Leberzirrhose, die bereits einleitend erläutert wurden, besonders interessant. Die Zufuhr von kurzen DNA- oder RNA-Molekülen ist dabei ein revolutionäres Werkzeug, um die gezielte Expression spezifischer Gene zu unterbinden, ohne dabei einen toxischen Effekt auszuüben (Salazar-Montes *et al.*, 2015). Derzeit wird das Prinzip der RNA-Interferenz weltweit genutzt, um potenzielle antifibrotische Ansätze zur Behandlung der Leberzirrhose zu entwickeln (Gonzalez-Rodriguez & Valverde, 2015). So konnte kürzlich der siRNA-vermittelte Knockdown von Bid, einem pro-apoptotischen Schlüsselmolekül in Hepatozyten, die durch CDAA (choline-deficient L-amino acid)-Diät induzierte NASH in C57BL/6 Mäusen reduzieren (Eguchi *et al.*, 2016). Zusätzlich erzielte die Liposom-vermittelte Applikation von Matrix-Metalloproteinase-2-siRNA eine signifikante Reduktion von α -SMA sowie Kollagen-1 in kultivierten HSC (Li *et al.*, 2015). Neben siRNA-Molekülen stehen weitere blockierende Nukleinsäuren zur therapeutischen posttranskriptionalen Modifikation zur Verfügung. Dabei erzielte die Zufuhr von TF-Sp1-spezifischer Oligodesoxynukleotide (ODN), Transforming Growth factor (TGF)-spezifischer microRNA (miRNA) sowie TIMP-1-spezifischer shRNA eine Reduktion der CCl₄-induzierten Leberfibrose in Ratten (Park *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2015). Dennoch stellt das Prinzip der RNA-Interferenz im Vergleich zu den anderen Antisense-Strategien das System mit der deutlich höheren Effektivität dar (Fakhr *et al.*, 2016) und scheint daher für einen gentherapeutischen Ansatz besonders geeignet zu sein.

Die positiven Ergebnisse einer siFoxf1-Behandlung bei cholestatischer Leberfibrose aus unserer ersten Studie konnten in Modellen des CCl₄-induzierten akuten und chronischen Leberschadens leider nicht verifiziert werden, was durch

signifikante Unterschiede in den genutzten Modellen bedingt sein kann. Jedes Modell besitzt spezifische Merkmale bezüglich des Pathomechanismus, den zeitlichen Verlauf sowie Schweregrad der Erkrankung und dem daraus differierenden optimalen Startzeitpunkt für eine Therapie.

Die therapeutische Applikation der DBTC-Foxf1-siRNA erzielte in unserem akuten Versuchsmodell zwar eine verminderte Foxf1-mRNA-Expression, hatte jedoch keinen Einfluss auf das Ausmaß des Leberschadens und die Aktivierung von HSC. Da HSC eher in chronischen Prozessen involviert sind, scheint Foxf1 kein geeignetes Targetgen im akuten Leberschaden zu sein. Im Gegensatz dazu zeigten Kalinichenko *et al.* in Foxf1^{+/-} Mäusen eine verminderte Induktion von α -SMA sowie eine ausbleibende Expression von Kollagen-1 an Tag 3 nach CCl₄-Applikation (Kalinichenko *et al.*, 2003). Die von ihnen verwendete CCl₄-Dosis entsprach dabei der von uns gewählten Dosis (0,5 μ l/g; Verdünnung 1:20) und ist auch mit anderen Studien in Einklang zu bringen. Auch die Arbeitsgruppe um Niu *et al.* verwendete eine äquivalente Dosierung, um die Beteiligung des TGF- β 1/Smad Signalswegs in Mäusen mit akutem CCl₄-induzierten Leberschaden nachzuweisen (Niu *et al.*, 2016). Andere Arbeitsgruppen wählten eine Dosierung von 0,25 μ l/g bei einer Verdünnung von 1:3, um die Effekte von Hyaluron-Synthase-3-defizienten Mäusen nach akuter Leberschädigung nachzuweisen (McCracken *et al.*, 2016). Noch höhere Dosen wurden durch die Arbeitsgruppe um Hu *et al.* angewendet (1,2 μ l/g; Verdünnung 1:1), um regenerative Eigenschaften der Leber nach akuter Schädigung zu verifizieren (Hu *et al.*, 2016). Dass die in der vorliegenden Studie genutzte Dosierung zur Induktion eines akuten Leberschadens ausreichend ist, konnte durch die stark ausgebildeten zentrilobulären Nekrosen in HE-gefärbten Leberschnitten sowie durch bis zu 60-fach erhöhte Lebertransaminasen an Tag 3 nach CCl₄-Applikation nachgewiesen werden. Die Auswahl unseres Untersuchungszeitpunktes wurde maßgeblich durch die Erkenntnisse von Kalinichenko *et al.* beeinflusst, welche nach CCl₄-Schädigung in Wildtyp-Mäusen die stärkste α -SMA und Kollagen-1 Expression an Tag 3 beobachteten, bevor an Tag 7 wieder das Ausgangsniveau erreicht wurde (Kalinichenko *et al.*, 2003). Unter der Voraussetzung des gleichen Untersuchungszeitpunktes, einer identischen CCl₄-Dosierung und vergleichbarer Analysemethoden legt der Vergleich unserer Ergebnisse mit denen von Kalinichenko *et al.*

die Vermutung nahe, dass die beschriebene Hepatoprotektion auf der Grundlage eines Foxf1-Knockdowns lediglich in transgenen Tieren (Foxf1^{+/-} bei Kalinichenko *et al.*, 2003) zum Tragen kommt. Dies wurde jedoch durch die Studie unserer Arbeitsgruppe um Abshagen *et al.* (2015a) widerlegt. Durch die Applikation der identischen DBTC-Foxf1-siRNA konnte nicht nur die HSC-Aktivität *in vitro* gehemmt, sondern zusätzlich die Leberfibrosierung in Mäusen mit BDL-induzierter Leberfibrose gemildert werden (Abshagen *et al.*, 2015a). Dabei zeigte sich eine ausgeprägte Hemmung der α -SMA- und Kollagen-1 α -Expression zu späteren Untersuchungszeitpunkten, als Hinweis auf eine reduzierte HSC-Aktivierung. Dennoch konnte, trotz wiederholter Applikation von DBTC-Foxf1-siRNA alle 72 h nach BDL, lediglich an Tag 2 eine signifikante Reduktion der Foxf1-Expression erzielt werden. Dies wurde durch die im Verlauf der Leberschädigung immer weiter zunehmende Zerstörung der normalen Leberarchitektur erklärt, welche die Blutzufuhr reduziert und damit folglich die suffiziente Aufnahme der systemisch applizierten DBTC-Foxf1-siRNA in HSC hemmt. Beweisend hierfür ist, dass die detektierte Immunfluoreszenz von markierten Lipoplexten nach systemischer Applikation von 30,6% in gesunden Lebern auf nur noch 6,3% in fibrotischen Lebern absank (Tag 5 nach BDL) (Abshagen *et al.*, 2015a). Dieses Phänomen bietet eine mögliche Erklärung für das fehlende Foxf1-Silencing in unserem chronischen Versuchsmodell, wobei wir nicht wissen, ob es zu einem früheren Zeitpunkt zu einem Foxf1-silencing gekommen ist, da unsere Untersuchungen ausschliesslich nach 6 Wochen durchgeführt wurden. Während die Applikation der DBTC-Foxf1-siRNA im akuten Modell prophylaktisch erfolgte und damit eine suffiziente Zufuhr im gesunden Gewebe ermöglicht wurde, erhielten die Tiere im chronischen Versuchsmodell eine therapeutische Behandlung nach bereits 4-wöchiger CCl₄-Gabe (s. Kapitel 4.3). Die zu diesem Zeitpunkt bereits abgelaufenen hepatischen Umbauvorgänge führen dabei nicht nur zu veränderten Strömungseigenschaften mit reduziertem Blutfluss, sondern zusätzlich zum Verlust der Endothelfenestrierung im Lebersinusoid (Schaffner & POPER, 1963; DeLeve, 2007), was zusätzlich zur verminderten Aufnahme von DBTC-Foxf1-siRNA in den Dissé-Raum bzw. HSC beiträgt.

Die von uns zur Analyse herangezogene RT-PCR sowie die laborchemischen und immunhistochemischen Untersuchungen zeigten ebenfalls keinen positiven

Effekt der therapeutischen DBTC-Foxf1-siRNA im chronischen CCl₄-Modell und waren damit zur ausbleibenden Foxf1-Reduktion konkordant. Lediglich die laborchemische Analyse der GLDH ergab eine signifikante Reduktion durch die therapeutische DBTC-Foxf1-siRNA Gabe.

Die nur minimal erhöhten und damit fast normwertigen Transaminasen sind hier nicht auf eine zu geringe Leberschädigung zurückzuführen, sondern können durch die hepatozelluläre Adaptation bei wiederholter toxischer Schädigung erklärt werden (Mederacke, 2013). Während das Blutbild in Tieren mit akutem Leberschaden völlig unauffällig war, zeigte die Therapiegruppe im chronischen Modell signifikant thrombozytopenische Werte. Durch die Applikation der DBTC-Luci-siRNA wurden ebenfalls leicht negative Abweichungen von der Norm festgestellt. Die bereits einleitend beschriebene Ablagerung der DBTC-Formulierungen im Milzgewebe könnte eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen bieten. Analog zum humanen Hypersplenismus wäre eine Hyperfunktionalität der murinen Milz, einhergehend mit einem vermehrten Thrombozytenabbau als Folge der Ablagerung denkbar.

Die CCl₄-Dosierung, das Lösungsverhältnis, das Applikationsintervall sowie die gewählte Dauer des chronischen Leberschädigungsmodells entsprachen dabei dem in der Literatur beschriebenen Versuchsdesign (Mederacke, 2013; Constantinou *et al.*, 2005; Liedtke *et al.*, 2013) und können somit als Ursache für eine übermäßige Schädigung, die in einer verminderten Wirkstoffaufnahme resultieren könnte, ausgeschlossen werden. Zusätzlich scheint der Zeitpunkt der Gewebeentnahme in Relation zur letzten CCl₄-Applikation eine entscheidende Rolle zu spielen. Wird dieser zu früh gewählt, besteht die Gefahr, sich in einer zu starken nekroinflammatorischen Phase zu befinden, während bei zu später Analyse der bereits einsetzende Wiederherstellungsprozess überwiegen kann. Der empfohlene Untersuchungszeitpunkt liegt daher 48 h nach letztmaliger CCl₄-Applikation (Starkel & Leclercq, 2011). Unsere Analysen im chronischen Versuchsmodell wurden an Tag 42 nach Versuchsbeginn und damit 72 h nach letztmaliger CCl₄-Applikation durchgeführt und fallen somit in die pro-fibrotische Regenerationsphase. Daher konnten wir weder histologisch noch systemisch (GLDH Aktivität) Anzeichen von Nekrose beobachten. Zusätzlich muss beachtet

werden, dass die therapeutischen Injektionen bereits ab der 5. Woche durchgeführt wurden, sodass ein potenzieller Foxf1-Knockdown zu einem früheren Untersuchungszeitpunkt nicht ausgeschlossen werden kann.

Die beeindruckenden therapeutischen Effekte durch die Applikation von DBTC-Foxf1-siRNA im cholestatischen Leberschädigungsmodell unserer Arbeitsgruppe (Abshagen *et al.*, 2015a) legen die Vermutung nahe, dass neben dem suboptimalen Untersuchungszeitpunkt im vorliegenden chronischen Modell sowie der veränderten Mikrozirkulation in der fibrotischen Leber, die modellspezifischen Unterschiede für die mangelnde Effektivität im CCl₄-Modell verantwortlich sind. Passend dazu wurden in Kapitel 6.1 bereits pathophysiologische Unterschiede sowie die differierenden Lokalisationen der sich ausbildenden Fibrose der beiden Schädigungsmodelle diskutiert.

6.3 Zusammenfassung und Ausblick

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass die Applikation von DBTC-Foxf1-siRNA keinen Einfluss auf die CCl₄-induzierte akute und chronische Leberschädigung ausübt. Trotz des nachgewiesenen Foxf1-Knockdowns im akuten Versuchsmodell, was zumindest die Eignung der verwendeten Lipoplexe als Gentransfersystem bestätigt, konnten keine wesentlichen hepatoprotektiven Effekte nachgewiesen werden. Im chronischen Versuchsmodell blieb der erwartete Foxf1-Knockdown hingegen aus. Einhergehend damit zeigten weder laborchemische und immunhistochemische noch molekularbiologische Analysen einen hepatoprotektiven Effekt.

Trotz der mangelnden Effektivität der DBTC-Foxf1-siRNA in der vorliegenden Arbeit muss eine generelle Ineffektivität des gewählten Ansatzes negiert werden. Die durch unsere Arbeitsgruppe nachgewiesenen therapeutischen Effekte im cholestatischen Leberschädigungsmodell lassen eine klinische Anwendbarkeit im Rahmen cholestatischer Lebererkrankungen als potenziell möglich erscheinen. Diese unterschiedlichen Ergebnisse unterstreichen die Wichtigkeit der Untersuchung von experimentellen Therapien in verschiedenen Schädigungsmodellen. Auch wenn moderne siRNA-Formulierungen bislang nicht kommerziell

angewendet werden, haben etliche siRNA-basierte Therapeutika, darunter auch siRNA-Lipoplexe, die klinische Phase der Erprobung erreicht (Singh *et al.*, 2015) und bestärken damit eine weitere Erprobung des vorliegenden gentherapeutischen Ansatzes. Um selbigen weiter zu optimieren und den Knockdown zu intensivieren, sollten zukünftig 3 verschiedene siRNA-Moleküle pro adressiertem Gen designed werden, um maximale Effekte durch Gen-Silencing zu erzielen (Fakhr *et al.*, 2016). Neben der technischen Optimierung des siRNA-basierten Vorgehens steht die Forderung nach Interventionsstrategien im Raum, welche gleichzeitig mehrere pathogenetisch relevante Schlüsselmoleküle bzw. Signalwege im Fibrosierungsprozess adressieren, um eine klinische Anwendbarkeit in greifbare Nähe zu rücken (Trautwein *et al.*, 2015). Überträgt man diese Forderung auf die vorliegende Arbeit, könnte eine kombinierte Adressierung von HSC-aktivierenden und -inhibierenden Transkriptionsfaktoren therapeutische Effekte über cholestatische Erkrankungen hinaus bewirken. Neben dem in der vorliegenden Studie adressierten, aktivierenden Transkriptionsfaktor Foxf1 wird JunD als zweiter bedeutender Vertreter der aktivierenden Transkriptionsfaktoren der HSC beschrieben (Friedman, 2008). Die Arbeitsgruppe um Smart *et al.* zeigte bereits 2006, dass JunD^{-/-} Mäuse vor CCl₄-induzierter Fibrose geschützt waren, was sich durch reduzierte Kollagenablagerung und reduzierte Anzahl α -SMA-positiver Zellen zeigte (Smart *et al.*, 2006). Bereits 2 Jahre zuvor wurde die Grundlage für das Wissen um den wichtigsten inhibierenden Transkriptionsfaktor geschaffen, indem in Lhx2^{-/-} Mäuseembryonen eine vermehrte Anzahl an α -SMA-positiver Zellen sowie eine vermehrte Ablagerung von Kollagen im Vergleich zu WT-Mäusen beobachtet wurde. Darüber hinaus zeigte die Transfektion humaner HSC-Linien mit Lhx2-cDNA eine verminderte Expression profibrotischer Gene, was die Funktion von Lhx2 als hemmenden Transkriptionsfaktor der HSC bestätigte (Wandzioch *et al.*, 2004).

Zukünftig könnten somit unter Verwendung eines Lipoplex-basierten Vektors Foxf1- bzw. JunD-spezifische siRNA-Moleküle designed und in HSC eingebracht werden und über das zusätzliche Einschleusen entsprechender Nukleinsäuren eine Überexpression des inhibierenden Transkriptionsfaktors Lhx2 bewirkt werden. Diese gentherapeutische Kombinationstherapie, welche mehrere HSC-spe-

zifische Transkriptionsfaktoren ansteuert, könnte somit um ein Vielfaches wirksamer sein und eine mögliche Option für eine potenzielle klinische Anwendbarkeit darstellen.

7 Thesen zur Dissertation

- Durch die weltweit wachsende Inzidenz und Mortalität stellt die Leberzirrhose ein Krankheitsbild mit hoher sozioökonomischer Problematik dar.
- Die bislang einzige kausale Therapiemöglichkeit besteht in der OLT (Orthotrope Lebertransplantation), die aufgrund des Spenderorganmangels die Entwicklung alternativer Therapiestrategien erfordert.
- Die hepatische Sternzelle (HSC) stellt aufgrund ihrer Schlüsselfunktion im Rahmen des Fibrosierungsprozesses sowie ihrer Funktion als Hauptproduzent der Extrazellulären Matrix ein geeignetes Ziel in der Entwicklung neuer Therapiestrategien dar.
- Foxf1 ist als bedeutender aktivierender Transkriptionsfaktor der HSC für eine antifibrotische Therapie von besonderem Interesse.
- Der gentherapeutische Ansatz der RNA-Interferenz stellt im Vergleich zu anderen Antisense-Strategien das Prinzip mit der höchsten Effektivität dar und ist daher für einen antifibrotischen Therapieansatz besonders gut geeignet.
- DBTC stellt ein leberspezifisches Lipid-basiertes Delivery-System für siRNA dar.
- Es sollte in murinen Modellen untersucht werden, inwieweit die Applikation von DBTC-Foxf1-siRNA im Modell der akuten sowie chronischen CCl₄ (Tetrachlorkohlenstoff)-Leberschädigung die Aktivierung der HSC inhibiert und somit einen hepatoprotektiven Effekt erzielt.
- Die einmalige Applikation von CCl₄ führt zur Induktion eines akuten Leberschadens. Die wiederholte Applikation über sechs Wochen führt zur chronischen Leberschädigung bzw. Ausprägung einer Leberfibrose.
- Der Foxf1-mRNA-Knockdown im akuten CCl₄-Versuchsmodell bestätigt die Wirksamkeit der verwendeten Lipoplexe als Gentransfersystem.
- Das Foxf1-Silencing hatte keinen Einfluss auf die CCl₄-induzierte akute Leberschädigung.
- Der ausbleibende Foxf1-mRNA-Knockdown im chronischen CCl₄-Modell verdeutlicht die wesentlichen pathophysiologischen Unterschiede zwischen einem akutem und chronischen Leberschaden und unterstreicht die Wichtigkeit

in der Auswahl des Leberschädigungsmodells und des Untersuchungszeitpunktes.

- Beeindruckende therapeutische Effekte des gleichen Therapieansatzes im Modell der cholestatischen Leberschädigung unserer Arbeitsgruppe zeigen wesentliche Unterschiede in der Pathophysiologie zwischen CCl₄-induziertem und cholestatischem Leberschaden und negieren eine generelle Ineffektivität des gewählten Ansatzes.
- Die vorliegende Studie verdeutlicht, dass potenzielle Therapiegene bzw. die Wirksamkeit von Therapeutika in verschiedenen Modellen und Pathologien untersucht werden sollten.
- Zukünftig könnte eine Wirksamkeit des gewählten Ansatzes verstärkt werden, indem eine kombinierte Adressierung von HSC-aktivierenden und -inhibierenden Transkriptionsfaktoren realisiert würde.

8 Literaturverzeichnis

Abraldes J, Pasarin M, Garcia-Pagan J. Animal models of portal hypertension. *World journal of gastroenterology*, 2006; 12 (41): 6577–6584.

Abshagen K, Brensel M, Genz B, Roth K, Thomas M, Fehring V, Schaeper U, Vollmar B. Foxf1 siRNA delivery to hepatic stellate cells by DBTC lipoplex formulations ameliorates fibrosis in livers of bile duct ligated mice. *Current gene therapy*, 2015a; 15 (3): 215–227.

Abshagen K, König M, Hoppe A, Müller I, Ebert M, Weng H, Holzhütter H, Zanger U, Bode J, Vollmar B, Thomas M, Dooley S. Pathobiochemical signatures of cholestatic liver disease in bile duct ligated mice. *BMC Systems Biology*, 2015b; 9 (1): 1099.

Abshagen K, Senne M, Genz B, Thomas M, Vollmar B. Differential Effects of Axin2 Deficiency on the Fibrogenic and Regenerative Response in Livers of Bile Duct-Ligated Mice. *European surgical research. Europäische chirurgische Forschung. Recherches chirurgicales europeennes*, 2015c; 55 (4): 328–340.

Alexander K, Flasnoecker M. *Thiemes innere Medizin*. Stuttgart. Thieme (1999).

Allam A, Gabr S, Ajarem J, Abdel-Maksoud M. Bcl-2 and p53 expression in hepatic tissues of Egyptian patients with Chronic Hepatitis C. *JPMA. The Journal of the Pakistan Medical Association*, 2015; 65 (11): 1186–1192.

Anthony P, Ishak K, Nayak N, Poulsen H, Scheuer P, Sobin L. The morphology of cirrhosis: definition, nomenclature, and classification. *Bulletin of the World Health Organization*, 1977; 55 (4): 521–540.

Atta H, El-Rehany M, Hammam O, Abdel-Ghany H, Ramzy M, Roderfeld M, Roeb E, Al-Hendy A, Raheim S, Allam H, Marey H. Mutant MMP-9 and HGF gene transfer enhance resolution of CCl4-induced liver fibrosis in rats: role of ASH1 and EZH2 methyltransferases repression. *PloS one*, 2014; 9 (11): e112384.

Baba S, Fujii H, Hirose T, Yasuchika K, Azuma H, Hoppo T, Naito M, Machimoto T, Ikai I. Commitment of bone marrow cells to hepatic stellate cells in mouse. *Journal of hepatology*, 2004; 40 (2): 255–260.

Bansal R, Prakash J, Post E, Beljaars L, Schuppan D, Poelstra K. Novel engineered targeted interferon-gamma blocks hepatic fibrogenesis in mice. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 2011; 54 (2): 586–596.

Bansal R, Prakash J, Ruiter M de, Poelstra K. Interferon gamma peptidomimetic targeted to hepatic stellate cells ameliorates acute and chronic liver fibrosis in vivo. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 2014; 179: 18–24.

Bataller R, Brenner D. Hepatic stellate cells as a target for the treatment of liver fibrosis. *Seminars in liver disease*, 2001; 21 (3): 437–451.

Bataller R, Brenner D. Liver fibrosis. *The Journal of clinical investigation*, 2005; 115 (2): 209–218.

Beljaars L, Meijer D, Poelstra K. Targeting hepatic stellate cells for cell-specific treatment of liver fibrosis. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 2002; 7: 22.

Blachier M, Leleu H, Peck-Radosavljevic M, Valla D, Roudot-Thoraval F. The burden of liver disease in Europe. *Journal of hepatology*, 2013; 58 (3): 593–608.

Blomhoff R, Wake K. Perisinusoidal stellate cells of the liver: important roles in retinol metabolism and fibrosis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 1991; 5 (3): 271–277.

Bobbin M, Rossi J. RNA Interference (RNAi)-Based Therapeutics: Delivering on the Promise? *Annual review of pharmacology and toxicology*, 2016; 56: 103–122.

Bouwens L, Baekeland M, Zanger R de, Wisse E. Quantitation, tissue distribution and proliferation kinetics of Kupffer cells in normal rat liver. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 1986; 6 (4): 718–722.

Cerutti H, Casas-Mollano J. On the origin and functions of RNA-mediated silencing: from protists to man. *Current genetics*, 2006; 50 (2): 81–99.

Chang M, Yeh C, Chang P, Chen J. Comparison of murine cirrhosis models induced by hepatotoxin administration and common bile duct ligation. *World journal of gastroenterology*, 2005; 11 (27): 4167–4172.

Chirapongsathorn S, Talwalkar J, Kamath P. Readmission in Cirrhosis: a Growing Problem. *Current treatment options in gastroenterology*, 2016; 14 (2): 236–246.

Constandinou C, Henderson N, Iredale J. Modeling liver fibrosis in rodents. *Methods in molecular medicine*, 2005; 117: 237–250.

Czauderna F, Fechtner M, Dames S, Aygun H, Klippel A, Pronk G, Giese K, Kaufmann J. Structural variations and stabilising modifications of synthetic siRNAs in mammalian cells. *Nucleic acids research*, 2003; 31 (11): 2705–2716.

DeLeve L. Hepatic microvasculature in liver injury. *Seminars in liver disease*, 2007; 27 (4): 390–400.

Delgado I, Carrasco M, Cano E, Carmona R, Garcia-Carbonero R, Marin-Gomez L, Soria B, Martin F, Cano D, Munoz-Chapuli R, Rojas A. GATA4 loss in the septum transversum mesenchyme promotes liver fibrosis in mice. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 2014; 59 (6): 2358–2370.

Diaz Gómez, Maria I, Fanelli S, Delgado de Layño, Aurora M A, Castro J, Castro G. Liver nuclear and microsomal CYP2E1-mediated metabolism of xenobiotics in rats chronically drinking an alcohol-containing liquid diet. *Toxicology and industrial health*, 2006; 22 (9): 367–374.

Domenicali M, Caraceni P, Giannone F, Baldassarre M, Lucchetti G, Quarta C, Patti C, Catani L, Nanni C, Lemoli R, Bernardi M. A novel model of CCl4-induced cirrhosis with ascites in the mouse. *Journal of hepatology*, 2009; 51 (6): 991–999.

Duncan S. Transcriptional regulation of liver development. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 2000; 219 (2): 131–142.

Eguchi A, De Mollerat Du Jeu, Xavier, Johnson C, Nektaria A, Feldstein A. Liver Bid suppression for treatment of fibrosis associated with non-alcoholic steatohepatitis. *Journal of hepatology*, 2016; 64 (3): 699–707.

Elpek G. Cellular and molecular mechanisms in the pathogenesis of liver fibrosis. *World Journal of Gastroenterology*, 2014; 20 (23): 7260.

El-Serag H. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 2012; 142 (6): 1264-1273.e1.

Eng F, Friedman S. Fibrogenesis I. New insights into hepatic stellate cell activation: the simple becomes complex. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 2000; 279 (1): G7-G11.

Eng F, Friedman S. Transcriptional regulation in hepatic stellate cells. *Seminars in liver disease*, 2001; 21 (3): 385–395.

Fakhr E, Zare F, Teimoori-Toolabi L. Precise and efficient siRNA design: a key point in competent gene silencing. *Cancer gene therapy*, 2016; 23 (4): 73–82.

Fehring V, Schaeper U, Ahrens K, Santel A, Keil O, Eisermann M, Giese K, Kaufmann J. Delivery of therapeutic siRNA to the lung endothelium via novel Lipoplex formulation DACC. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 2014; 22 (4): 811–820.

Fire A, Xu S, Montgomery M, Kostas S, Driver S, Mello C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998; 391 (6669): 806–811.

Friedman S. Liver fibrosis -- from bench to bedside. *Journal of hepatology*, 2003; 38 Suppl 1: 53.

Friedman S. Hepatic Stellate Cells. *Physiological Reviews*, 2008; 88 (1): 125–172.

Gabele E, Brenner D, Rippe R. Liver fibrosis: signals leading to the amplification of the fibrogenic hepatic stellate cell. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 2003; 8: 77.

Garcia-Tsao G, Sanyal A, Grace N, Carey W. Prevention and management of gastroesophageal varices and variceal hemorrhage in cirrhosis. *Hepatology*, 2007; 46 (3): 922–938.

Geerts A. History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Seminars in liver disease*, 2001; 21 (3): 311–335.

Georgiev P, Jochum W, Heinrich S, Jang J, Nocito A, Dahm F, Clavien P. Characterization of time-related changes after experimental bile duct ligation. *The British journal of surgery*, 2008; 95 (5): 646–656.

Gonzalez-Rodriguez A, Valverde A. RNA Interference as a Therapeutic Strategy for the Treatment of Liver Diseases. *Current pharmaceutical design*, 2015; 21 (31): 4574–4586.

Gonzalo T, Beljaars L, van de Bovenkamp M, Temming K, van Loenen A, Reker-Smit C, Meijer D, Lacombe M, Opdam F, Keri G, Orfi L, Poelstra K, Kok R. Local inhibition of liver fibrosis by specific delivery of a platelet-derived growth factor kinase inhibitor to hepatic stellate cells. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 2007; 321 (3): 856–865.

Gressner A, Weiskirchen R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF- β . *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2006; 10 (1): 76–99.

Haasnoot J, Westerhout E, Berkhout B. RNA interference against viruses: strike and counterstrike. *Nature biotechnology*, 2007; 25 (12): 1435–1443.

Hao P, Lee M, Yu G, Kim I, Cho Y, Kim D. Isolation of EpCAM(+)/CD133 (-) hepatic progenitor cells. *Molecules and cells*, 2013; 36 (5): 424–431.

Hernandez-Gea V, Friedman S. Pathogenesis of Liver Fibrosis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 2011; 6 (1): 425–456.

Herold G. *Innere Medizin* 2011. Köln. Selbstverl. (2011).

Herrmann F, Müller P, Lohmann T. *Endokrinologie für die Praxis*. Stuttgart. Thieme (2010).

Hillebrandt S, Goos C, Matern S, Lammert F. Genome-wide analysis of hepatic fibrosis in inbred mice identifies the susceptibility locus *Hfib1* on chromosome 15. *Gastroenterology*, 2002; 123 (6): 2041–2051.

Horn F, Armbruster M, Dospil A. *Biochemie des Menschen*. Stuttgart. Thieme (2009).

Hu M, Li S, Menon S, Liu B, Hu M, Longaker M, Lorenz H. Expansion and Hepatic Differentiation of Adult Blood-Derived CD34+ Progenitor Cells and Promotion of Liver Regeneration After Acute Injury. *Stem cells translational medicine*, 2016; 5 (6): 723–732.

Hung K, Lee T, Chou W, Wu C, Cho C, Lu C, Jawan B, Wang C. Interleukin-10 gene therapy reverses thioacetamide-induced liver fibrosis in mice. *Biochemical and biophysical research communications*, 2005; 336 (1): 324–331.

Immordino M, Dosio F, Cattel L. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *International journal of nanomedicine*, 2006; 1 (3): 297–315.

Iredale J. Models of liver fibrosis. *Journal of Clinical Investigation*, 2007; 117 (3): 539–548.

Jia J, Han D, Xu R, Gao F, Zhao L, Zhao Y, Yan J, Ma X. Effect of endotoxin on fibronectin synthesis of rat primary cultured hepatocytes. *World journal of gastroenterology*, 1998; 4 (4): 329–331.

Kaestner K. The hepatocyte nuclear factor 3 (HNF3 or FOXA) family in metabolism. *Trends in endocrinology and metabolism*: TEM, 2000; 11 (7): 281–285.

Kalinichenko V, Bhattacharyya D, Zhou Y, Gusarova G, Kim W, Shin B, Costa R. Foxf1 +/- mice exhibit defective stellate cell activation and abnormal liver regeneration following CCl4 injury. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 2003; 37 (1): 107–117.

Kalinichenko V, Zhou Y, Bhattacharyya D, Kim W, Shin B, Bambal K, Costa R. Haploinsufficiency of the mouse Forkhead Box f1 gene causes defects in gall bladder development. *The Journal of biological chemistry*, 2002; 277 (14): 12369–12374.

Kaplan M, Gershwin M. Primary biliary cirrhosis. *The New England journal of medicine*, 2005; 353 (12): 1261–1273.

Kaufmann E, Knochel W. Five years on the wings of fork head. *Mechanisms of development*, 1996; 57 (1): 3–20.

Kondou H, Mushiaki S, Etani Y, Miyoshi Y, Michigami T, Ozono K. A blocking peptide for transforming growth factor- β 1 activation prevents hepatic fibrosis in vivo. *Journal of hepatology*, 2003; 39 (5): 742–748.

Kountouras J, Billing B, Scheuer P. Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. *British journal of experimental pathology*, 1984; 65 (3): 305–311.

Kristensen D, Kawada N, Imamura K, Miyamoto Y, Tateno C, Seki S, Kuroki T, Yoshizato K. Proteome analysis of rat hepatic stellate cells. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 2000; 32 (2): 268–277.

Kuntz E, Kuntz H. *Hepatology textbook and atlas*. Berlin, Heidelberg. Springer Berlin Heidelberg (2008).

Lang G. *Histotechnik*. Wien. Springer (2013).

Lee H, Jeong H, Park S, Yoo W, Choi S, Choi K, Lee M, Lee M, Cha D, Kim Y, Han J, Kim W, Park S, Oh J. Fusion protein of retinol-binding protein and albumin domain III reduces liver fibrosis. *EMBO molecular medicine*, 2015a; 7 (6): 819–830.

Lee Y, Wallace M, Friedman S. Pathobiology of liver fibrosis. *Gut*, 2015b; 64 (5): 830–841.

Lehmann O, Sowden J, Carlsson P, Jordan T, Bhattacharya S. Fox's in development and disease. *Trends in Genetics*, 2003; 19 (6): 339–344.

Lei X, Fu W, Kim-Kaneyama J, Omoto T, Miyazaki T, Li B, Miyazaki A. Hic-5 deficiency attenuates the activation of hepatic stellate cells and liver fibrosis through upregulation of Smad7 in mice. *Journal of hepatology*, 2016; 64 (1): 110–117.

Li F, Li Q, Wang J, Zhan C, Xie C, Lu W. Effects of interferon-gamma liposomes targeted to platelet-derived growth factor receptor-beta on hepatic fibrosis in rats. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 2012; 159 (2): 261–270.

Li Y, Jiang Y. Update on isolation and functional research of hepatic stellate cells. *Sheng wu gong cheng xue bao = Chinese journal of biotechnology*, 2014; 30 (7): 1059–1072.

Li Y, Liu F, Ding F, Chen P, Tang M. Inhibition of liver fibrosis using vitamin A-coupled liposomes to deliver matrix metalloproteinase-2 siRNA in vitro. *Molecular medicine reports*, 2015; 12 (3): 3453–3461.

Liedtke C, Luedde T, Sauerbruch T, Scholten D, Streetz K, Tacke F, Tolba R, Trautwein C, Trebicka J, Weiskirchen R. Experimental liver fibrosis research. *Fibrogenesis & Tissue Repair*, 2013; 6 (1): 19.

Lin K, Dorman J, Rodan A, Kenyon C. daf-16: An HNF-3/forkhead family member that can function to double the life-span of *Caenorhabditis elegans*. *Science (New York, N.Y.)*, 1997; 278 (5341): 1319–1322.

Lindquist J, Stefanovic B, Brenner D. Regulation of collagen alpha1(I) expression in hepatic stellate cells. *Journal of gastroenterology*, 2000; 35 Suppl 12: 80–83.

Liu J, Cheng X, Guo Z, Wang Z, Li D, Kang F, Li H, Li B, Cao Z, Nassal M, Sun D. Truncated active human matrix metalloproteinase-8 delivered by a chimeric adenovirus-hepatitis B virus vector ameliorates rat liver cirrhosis. *PloS one*, 2013; 8 (1): e53392.

Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, Abraham J, Adair T, Aggarwal R, Ahn S, Alvarado M, Anderson H, Anderson L, Andrews K, Atkinson C, Bad-dour L, Barker-Collo S, Bartels D, Bell M, Benjamin E, Bennett D, Bhalla K, Bikbov B, Bin Abdulhak A, Birbeck G, Blyth F, Bolliger I, Boufous S, Bucello C, Burch M, Burney P, Carapetis J, Chen H, Chou D, Chugh S, Coffeng L, Colan S, Colquhoun S, Colson K, Condon J, Connor M, Cooper L, Corriere M, Cortinovis M, Vaccaro K de, Couser W, Cowie B, Criqui M, Cross M, Dabhadkar K, Dahodwala N, Leo D de, Degenhardt L, Delossantos A, Denenberg J, Des Jarlais D, Dharmaratne S, Dorsey E, Driscoll T, Duber H, Ebel B, Erwin P, Espindola P, Ezzati M, Feigin V, Flaxman A, Forouzanfar M, Fowkes F, Franklin R, Fransen M, Freeman M, Gabriel S, Gakidou E, Gaspari F, Gillum R, Gonzalez-Medina D, Halasa Y, Haring D, Harrison J, Havmoeller R, Hay R, Hoen B, Hotez P, Hoy D, Jacobsen K, James S, Jasrasaria R, Jayaraman S, Johns N, Karthikeyan G, Kassebaum N, Keren A, Khoo J, Knowlton L, Kobusingye O, Koranteng A, Krishnamurthi R, Lipnick M, Lipshultz S, Ohno S, Mabweijano J, MacIntyre M, Mallinger L, March L, Marks G, Marks R, Matsumori A, Matzopoulos R, Mayosi B, McAnulty J, McDermott M, McGrath J, Mensah G, Merriman T, Michaud C, Miller M, Miller T, Mock C, Mocumbi A, Mokdad A, Moran A, Mulholland K, Nair M, Naldi L, Narayan K, Nasser K, Norman P, O'Donnell M, Omer S, Ortblad K, Osborne R, Ozgediz D, Pahari B, Pandian J, Rivero A, Padilla R, Perez-Ruiz F, Perico N, Phillips D, Pierce K, Pope C, Porrini E, Pourmalek F, Raju M, Ranganathan D, Rehm J, Rein D, Remuzzi G, Rivara F, Roberts T, Leon F de, Rosenfeld L, Rushton L, Sacco R, Salomon J, Sampson U, Sanman E, Schwebel D, Segui-Gomez M, Shepard D, Singh D, Singleton J, Sliwa K, Smith E, Steer A, Taylor J, Thomas B, Tleyjeh I, Towbin J, Truelsen T, Undurraga E, Venketasubramanian N, Vijayakumar L, Vos T, Wagner G, Wang M, Wang W, Watt K, Weinstock M, Weintraub R, Wilkinson J, Woolf A, Wulf S, Yeh P, Yip P, Zabetian A, Zheng Z, Lopez A, Murray C, AlMazroa M, Memish Z. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20

age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* (London, England), 2012; 380 (9859): 2095–2128.

Lu C, Lu J, Hua G, Zhu J, Wang H, Huang J, Gu M, Zhou Q, Ni R. Effects of antisense RNA of connective tissue growth factor expressing plasmid on rat liver fibrosis. *Zhonghua gan zang bing za zhi* = *Zhonghua ganzangbing zazhi* = Chinese journal of hepatology, 2007; 15 (2): 118–121.

Lu J, Langer R, Chen J. A novel mechanism is involved in cationic lipid-mediated functional siRNA delivery. *Molecular pharmaceutics*, 2009; 6 (3): 763–771.

Mahlapuu M, Ormestad M, Enerback S, Carlsson P. The forkhead transcription factor Foxf1 is required for differentiation of extra-embryonic and lateral plate mesoderm. *Development* (Cambridge, England), 2001a; 128 (2): 155–166.

Mahlapuu M, Ormestad M, Enerbäck S, Carlsson P. The forkhead transcription factor Foxf1 is required for differentiation of extra-embryonic and lateral plate mesoderm. *Development* (Cambridge, England), 2001b; 128 (2): 155–166.

Mann D, Smart D. Transcriptional regulation of hepatic stellate cell activation. *Gut*, 2002; 50 (6): 891–896.

March S, Hui E, Underhill G, Khetani S, Bhatia S. Microenvironmental regulation of the sinusoidal endothelial cell phenotype in vitro. *Hepatology*, 2009; 50 (3): 920–928.

Marek C, Tucker S, Konstantinou D, Elrick L, Haefner D, Sigalas C, Murray G, Goodwin B, Wright M. Pregnenolone-16 α -carbonitrile inhibits rodent liver fibrogenesis via PXR (pregnane X receptor)-dependent and PXR-independent mechanisms. *The Biochemical journal*, 2005; 387 (Pt 3): 601–608.

Margolis H, Coleman P, Brown R, Mast E, Sheingold S, Arevalo J. Prevention of hepatitis B virus transmission by immunization. An economic analysis of current recommendations. *JAMA*, 1995; 274 (15): 1201–1208.

Marra F, Aleffi S, Galastri S, Provenzano A. Mononuclear cells in liver fibrosis. *Seminars in Immunopathology*, 2009; 31 (3): 345–358.

Marshall J, Smith P, Hoyumpa A. Gastric varices. *The American Journal of Digestive Diseases*, 1977; 22 (11): 947–955.

Martín-Llahí M, Guevara M, Torre A, Fagundes C, Restuccia T, Gilabert R, Solá E, Pereira G, Marinelli M, Pavesi M, Fernández J, Rodés J, Arroyo V, Ginès P. Prognostic Importance of the Cause of Renal Failure in Patients With Cirrhosis. *Gastroenterology*, 2011; 140 (2): 488–496.e4.

Mathurin P, Bataller R. Trends in the management and burden of alcoholic liver disease. *Journal of hepatology*, 2015; 62 (1 Suppl): S38–46.

McCracken J, Jiang L, Deshpande K, O'Neil M, Pritchard M. Differential effects of hyaluronan synthase 3 deficiency after acute vs chronic liver injury in mice. *Fibrogenesis & tissue repair*, 2016; 9: 4.

McLean E, McLean A, Sutton P. Instant cirrhosis. An improved method for producing cirrhosis of the liver in rats by simultaneous administration of carbon tetrachloride and phenobarbitone. *British journal of experimental pathology*, 1969; 50 (5): 502–506.

Mederacke I. Liver fibrosis - mouse models and relevance in human liver diseases. *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 2013; 51 (1): 55–62.

Mehier-Humbert S, Guy R. Physical methods for gene transfer: improving the kinetics of gene delivery into cells. *Advanced drug delivery reviews*, 2005; 57 (5): 733–753.

Miyata E, Masuya M, Yoshida S, Nakamura S, Kato K, Sugimoto Y, Shibasaki T, Yamamura K, Ohishi K, Nishii K, Ishikawa F, Shiku H, Katayama N. Hematopoietic origin of hepatic stellate cells in the adult liver. *Blood*, 2008; 111 (4): 2427–2435.

Mokdad A, Lopez A, Shahrzad S, Lozano R, Mokdad A, Stanaway J, Murray C, Naghavi M. Liver cirrhosis mortality in 187 countries between 1980 and 2010. *BMC Medicine*, 2014; 12 (1): 2197.

Niu L, Cui X, Qi Y, Xie D, Wu Q, Chen X, Ge J, Liu Z. Involvement of TGF- β 1/Smad3 Signaling in Carbon Tetrachloride-Induced Acute Liver Injury in Mice. *PloS one*, 2016; 11 (5): e0156090.

Novo L, Mastrobattista E, van Nostrum C, Lammers T, Hennink W. Decationized polyplexes for gene delivery. *Expert opinion on drug delivery*, 2015; 12 (4): 507–512.

O'Leary J, Lepe R, Davis G. Indications for Liver Transplantation. *Gastroenterology*, 2008; 134 (6): 1764–1776.

Park J, Jo J, Kim K, Kim S, Lee W, Park K, Park J. Antifibrotic effect through the regulation of transcription factor using ring type-Sp1 decoy oligodeoxynucleotide in carbon tetrachloride-induced liver fibrosis. *The Journal of Gene Medicine*, 2009; 11 (9): 824–833.

Perz J, Armstrong G, Farrington L, Hutin Y, Bell B. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *Journal of hepatology*, 2006; 45 (4): 529–538.

Physiologie. Stuttgart. Thieme (2010).

Poelstra K, Beljaars L, Melgert B. Cell-specific delivery of biologicals: problems, pitfalls and possibilities of antifibrotic compounds in the liver. *Drug discovery today*, 2013; 18 (23-24): 1237–1242.

Purves W, Sadava D. Biologie. Heidelberg. Spektrum Akad. Verl. (2011).

Ramachandran P, Pellicoro A, Vernon M, Boulter L, Aucott R, Ali A, Hartland S, Snowdon V, Cappon A, Gordon-Walker T, Williams M, Dunbar D, Manning J, van Rooijen N, Fallowfield J, Forbes S, Iredale J. Differential Ly-6C expression identifies the recruited macrophage phenotype, which orchestrates the regression of murine liver fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012; 109 (46): E3186–E3195.

Raucy J, Kraner J, Lasker J. Bioactivation of halogenated hydrocarbons by cytochrome P4502E1. *Critical reviews in toxicology*, 1993; 23 (1): 1–20.

Rehm J, Room R, Graham K, Monteiro M, Gmel G, Sempos C. The relationship of average volume of alcohol consumption and patterns of drinking to burden of disease: an overview. *Addiction (Abingdon, England)*, 2003; 98 (9): 1209–1228.

Rehman Z, Hoekstra D, Zuhorn I. Mechanism of polyplex- and lipoplex-mediated delivery of nucleic acids: real-time visualization of transient membrane destabilization without endosomal lysis. *ACS nano*, 2013; 7 (5): 3767–3777.

Rippe R, Brenner D. From quiescence to activation: Gene regulation in hepatic stellate cells. *Gastroenterology*, 2004; 127 (4): 1260–1262.

Rodés J. *Textbook of hepatology*. Malden, MA. Blackwell (2007).

Rodriguez-Roisin R, Krowka M, Herve P, Fallon M. Pulmonary-Hepatic vascular Disorders (PHD). *The European respiratory journal*, 2004; 24 (5): 861–880.

Salazar-Montes A, Hernandez-Ortega L, Lucano-Landeros M, Armendariz-Borunda J. New gene therapy strategies for hepatic fibrosis. *World journal of gastroenterology*, 2015; 21 (13): 3813–3825.

Santel A, Aleku M, Keil O, Endruschat J, Esche V, Fisch G, Dames S, Löffler K, Fechtner M, Arnold W, Giese K, Klippel A, Kaufmann J. A novel siRNA-lipoplex technology for RNA interference in the mouse vascular endothelium. *Gene therapy*, 2006; 13 (16): 1222–1234.

Schaffner F, POPER H. Capillarization of hepatic sinusoids in man. *Gastroenterology*, 1963; 44: 239–242.

Schon H, Bartneck M, Borkham-Kamphorst E, Nattermann J, Lammers T, Tacke F, Weiskirchen R. Pharmacological Intervention in Hepatic Stellate Cell Activation and Hepatic Fibrosis. *Frontiers in pharmacology*, 2016; 7: 33.

Schon H, Weiskirchen R. Immunomodulatory effects of transforming growth factor-beta in the liver. *Hepatobiliary surgery and nutrition*, 2014; 3 (6): 386–406.

Schrier D, Kunkel R, Phan S. The role of strain variation in murine bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *The American review of respiratory disease*, 1983; 127 (1): 63–66.

Sicklick J, Choi S, Bustamante M, McCall S, Perez E, Huang J, Li Y, Rojkind M, Diehl A. Evidence for epithelial-mesenchymal transitions in adult liver cells. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 2006; 291 (4): 83.

Siller-Lopez F, Sandoval A, Salgado S, Salazar A, Bueno M, Garcia J, Vera J, Galvez J, Hernandez I, Ramos M, Aguilar-Cordova E, Armendariz-Borunda J. Treatment with human metalloproteinase-8 gene delivery ameliorates experimental rat liver cirrhosis. *Gastroenterology*, 2004; 126 (4): 1122.

Singh Y, Tomar S, Khan S, Meher J, Pawar V, Raval K, Sharma K, Singh P, Chaurasia M, Surendar Reddy B, Chourasia M. Bridging small interfering RNA with giant therapeutic outcomes using nanometric liposomes. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 2015; 220 (Pt A): 368–387.

Smart D, Green K, Oakley F, Weitzman J, Yaniv M, Reynolds G, Mann J, Millward-Sadler H, Mann D. JunD is a profibrogenic transcription factor regulated by Jun N-terminal kinase-independent phosphorylation. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 2006; 44 (6): 1432–1440.

Song G, Pacher M, Balakrishnan A, Yuan Q, Tsay H, Yang D, Reetz J, Brandes S, Dai Z, Pützer B, Araújo-Bravo M, Steinemann D, Luedde T, Schwabe R, Manns M, Schöler H, Schambach A, Cantz T, Ott M, Sharma A. Direct Reprogramming of Hepatic Myofibroblasts into Hepatocytes In Vivo Attenuates Liver Fibrosis. *Cell Stem Cell*, 2016.

Starkel P, Leclercq I. Animal models for the study of hepatic fibrosis. *Best practice & research. Clinical gastroenterology*, 2011; 25 (2): 319–333.

Stewart B. World Cancer Report 2014. Lyon. IARC Press (2014).

Swanson K, Wiesner R, Krowka M. Natural history of hepatopulmonary syndrome: Impact of liver transplantation. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 2005; 41 (5): 1122–1129.

Tacke F, Kroy D, Barreiros A, Neumann U. Liver transplantation in Germany. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*, 2016.

Tan H, San-Marina S, Wang N, Hong M, Li S, Li L, Cheung F, Wen X, Feng Y. Preclinical Models for Investigation of Herbal Medicines in Liver Diseases: Update and Perspective. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, 2016; 2016: 4750163.

Tang Y, Masuo Y, Sakai Y, Wakayama T, Sugiura T, Harada R, Futatsugi A, Komura T, Nakamichi N, Sekiguchi H, Sutoh K, Usumi K, Iseki S, Kaneko S, Kato Y. Localization of Xenobiotic Transporter OCTN1/SLC22A4 in Hepatic Stellate Cells and Its Protective Role in Liver Fibrosis. *Journal of pharmaceutical sciences*, 2016; 105 (5): 1779–1789.

Tao L, Zhai Y, Di Ding, Yin W, Liu X, Yu G. The role of C/EBP- α expression in human liver and liver fibrosis and its relationship with autophagy. *International journal of clinical and experimental pathology*, 2015; 8 (10): 13102–13107.

Taroncher-Oldenburg G, Marshall A. Trends in biotech literature 2006. *Nature biotechnology*, 2007; 25 (9): 961.

Thaci B, Ulasov I, Wainwright D, Lesniak M. The challenge for gene therapy: innate immune response to adenoviruses. *Oncotarget*, 2011; 2 (3): 113–121.

Trautwein C, Friedman S, Schuppan D, Pinzani M. Hepatic fibrosis: Concept to treatment. *Journal of hepatology*, 2015; 62 (1 Suppl): 24.

Tsukamoto H, Matsuoka M, French S. Experimental models of hepatic fibrosis: a review. *Seminars in liver disease*, 1990; 10 (1): 56–65.

Volpers C, Kochanek S. Adenoviral vectors for gene transfer and therapy. *The journal of gene medicine*, 2004; 6 Suppl 1: 71.

Wake K. "Sternzellen" in the liver: perisinusoidal cells with special reference to storage of vitamin A. *The American journal of anatomy*, 1971; 132 (4): 429–462.

Wake K. Perisinusoidal stellate cells (fat-storing cells, interstitial cells, lipocytes), their related structure in and around the liver sinusoids, and vitamin A-storing cells in extra-hepatic organs. *International review of cytology*, 1980; 66: 303–353.

Walkin L, Herrick S, Summers A, Brenchley P, Hoff C, Korstanje R, Margetts P. The role of mouse strain differences in the susceptibility to fibrosis: a systematic review. *Fibro-genesis & tissue repair*, 2013; 6 (1): 18.

Wandzioch E, Kolterud A, Jacobsson M, Friedman S, Carlsson L. Lhx2-/- mice develop liver fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004; 101 (47): 16549–16554.

Wang B, Dolinski B, Kikuchi N, Leone D, Peters M, Weinreb P, Violette S, Bissell D. Role of alpha6beta6 integrin in acute biliary fibrosis. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 2007; 46 (5): 1404–1412.

Weber L, Boll M, Stampfl A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Critical reviews in toxicology*, 2003; 33 (2): 105–136.

Williams R. Global challenges in liver disease. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 2006; 44 (3): 521–526.

Wilson J. Lessons learned from the gene therapy trial for ornithine transcarbamylase deficiency. *Molecular genetics and metabolism*, 2009; 96 (4): 151–157.

Wu J, Norton P. Animal models of liver fibrosis. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 1996; 31 (12): 1137–1143.

WU P, HUANG R, XIONG Y, WU C. Protective effects of curcumin against liver fibrosis through modulating DNA methylation. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 2016; 14 (4): 255–264.

You Q, Kong L, Li F, Wang H, Liu D, Pei F, Song J, Xu J, Chen J. Human recombinant endostatin Endostar attenuates hepatic sinusoidal endothelial cell capillarization in CCl₄induced fibrosis in mice. *Molecular medicine reports*, 2015; 12 (4): 5594–5600.

Yu J, Zhang S, Chu E, Go M, Lau R, Zhao J, Wu C, Tong L, Zhao J, Poon T, Sung J. Peroxisome proliferator-activated receptors gamma reverses hepatic nutritional fibrosis in mice and suppresses activation of hepatic stellate cells in vitro. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 2010; 42 (6): 948–957.

Zhang F, Kong D, Lu Y, Zheng S. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ as a therapeutic target for hepatic fibrosis: from bench to bedside. *Cellular and molecular life sciences* : CMLS, 2013; 70 (2): 259–276.

Zhu Y, Miao Z, Gong L, Chen W. Transplantation of mesenchymal stem cells expressing TIMP-1-shRNA improves hepatic fibrosis in CCl(4)-treated rats. *International journal of clinical and experimental pathology*, 2015; 8 (8):8912-8920

9 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

- Abb. 1: Makroskopische Bilder einer gesunden und zirrhotischen Leber
- Abb. 2: Lokalisation der HSC mit sinusoidalen Ereignissen nach Leberschädigung
- Abb. 3: Schematische Darstellung eines siRNA-Moleküls
- Abb. 4: Physikochemische Eigenschaften der DBTC-siRNA-Lipoplexe
- Abb. 5: Schematischer Versuchsaufbau des akuten Versuchsmodells
- Abb. 6: Schematischer Versuchsaufbau des chronischen Versuchsmodells
- Abb. 7: Histomorphometrische Auswertung HE-gefärbter Leberschnitte
- Abb. 8: Histomorphometrische Auswertung immunhistochemischer Leberschnitte
- Abb. 9: Relative Expression der Foxf1-mRNA des akuten Modells
- Abb. 10: Plasmaanalyse des akuten Modells
- Abb. 11: Prozentuale Darstellung nekrotischer Flächen des akuten Modells mit repräsentativen histologischen Bildern
- Abb. 12: Quantitative Analyse der α -SMA Immunhistochemie mit histologischen Darstellungen des akuten Modells
- Abb. 13: Relative Expression der Foxf1-mRNA des chronischen Modells
- Abb. 14: Plasmaanalyse des chronischen Modells
- Abb. 15: Relative Expression der Kollagen-1 α mRNA des chronischen Modells
- Abb. 16: Analyse der Kollagen-1 α positiven Fläche sowie immunhistochemische Bilder im chronischen Versuchsmodell
- Abb. 17: Quantitative Analyse der α -SMA Immunhistochemie mit histologischen Darstellungen des chronischen Modells
- Tab. 1: Leberzirrhose assoziierte Symptome
- Tab. 2: Auflistung der Primer für die RT-PCR
- Tab. 3: Vollblutanalyse des akuten Versuchsmodells
- Tab. 4: Vollblutanalyse des chronischen Versuchsmodells

10 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Untersuchung des antifibrotischen Potenzials von Foxf1-siRNA im Modell der akuten und chronischen CCl₄-Leberschädigung“ selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt zu haben.

Die den benutzten Werken sinngemäß oder wörtlich entnommene Stellen sind als solche gekennzeichnet. Darüber hinaus wurden keine Materialien oder Quellen verwendet, die nicht als solche kenntlich gemacht wurden.

Weiterhin versichere ich, dass diese Dissertation weder zum jetzigen noch zu einem früheren Zeitpunkt an der Universität Rostock oder einer anderen Hochschule zur Eröffnung eines Promotionsverfahrens eingereicht wurde.

Kempten, 03. Oktober 2016

Tobias Rotberg